DER TRANSPORT VON MONOSACCHARIDEN AN DER DÜNNDARMMUKOSA UND SEINE HEMMUNG

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
HEIDEMARIE VOGEL
aus Halle

Bonn 1979

DER TRANSPORT VON MONOSACCHARIDEN AN DER DÜNNDARMMUKOSA UND SEINE HEMMUNG

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
HEIDEMARIE VOGEL
aus Halle

Bonn 1979

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. O. Hockwin

2. Gutachter: Prof. Dr. F.W. Zilliken

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 1979

Aus der Abteilung Biochemie des Auges
(Leiter: Prof. Dr. O. Hockwin)
klinisches Institut für experimentelle Ophthalmologie der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. E. Weigelin)

Druck: R. Schwarzbold, Witterschlick

UNIV. LEIDEN BIBL.

Für die liebenswürdige Durchsicht
meiner Arbeit und die hilfsbereite
Unterstützung danke ich
Herrn Prof. Dr. O. Hockwin recht
herzlich.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. Einleitung 3

II. Problemstellung 4

III. Literaturübersicht 5

1. Aufbau der Dünndarmmukosa
2. Hypothesen über den Nichtelektrolytentransport durch Membranen
3. Der gekoppelte Monosaccharid - Na^+-Transport an der Darmschleimhaut und die verschiedenen Transportmodelle

IV. Experimenteller Teil 28

1. Tiermaterial, Präparation, Inkubation
2. Meßtechnik
3. Berechnung der Ergebnisse
4. Statistische Prüfung

V. Ergebnisse 53

VI. Diskussion 54

VII. Zusammenfassung 59

VIII. Literaturverzeichnis 60

I. Einleitung:

Erst seit knapp zwanzig Jahren beschäftigt sich die biochemische Forschung systematisch mit dem Stofftransport durch biologische Membranen. Durch zahlreiche Beispiele ist heute bekannt, daß Stofftransport und Stoffwechsel miteinander rückgekoppelt sind. Die "biologischen Membranen" stellen ein Grenzgebiet zwischen den Gebieten der Biochemie, physikalischen Chemie und der Biophysik dar.

Die Schaffung eines der Realität nahekommenden Membranmodells verlangt genaue Kenntnis über die Umformung chemischer Ernergie in osmotische Arbeit, des Mechanismus der Energiebereitstellung im Zellstoffwechsel (oxidative Phosphor ylierung) und der Synthese makromolekularer Verbindungen an Membranen.

Im vorangestellten Abschnitt dieser Arbeit werden Kenntnisse über die Struktur der Zellmembran und die allgemeine Theorie biologischer Transportprozesse aufgezeigt. Die Modelle und Theorien verschiedener Autoren werden gegenübergestellt und diskutiert, um die Entwicklungstendenzen in der Erforschung eines speziellen Gebietes zu zeigen.

Im experimentellen Teil werden Monosaccharidtransporte und die monosaccharid-induzierten Potentiale gemessen. Weiterhin werden die Auswirkung von Hemmstoffen auf den Monosaccharidtransport und die monosaccharid-induzierten Potentiale untersucht.

II. Problemstellung:

Die Theorie des Zuckertransportes ist heute an einer sehr kritischen Stelle angelangt und es ist schwierig zu entscheiden, welche Theorie der verschiedenen Autoren gültig ist. Die Fragestellungen waren: können Monosaccharidtransporte am Dünndarm von Ratten gemessen werden, können dabei Potentiale entstehen, die abgeleitet werden können, kann der Dünndarm so präpariert und gelagert werden, daß er noch weiterlebt und die Ergebnisse aussagekräftig sind ? Weiterhin wurde danach gefragt, ob der Transport der Galaktose durch 2.4 - Dinitrophenol oder Monojodessigsäure gestört oder gar vollständig gehemmt werden kann.

III. Literaturübersicht:

1. Aufbau der Dünndarmmukosa

Der Monosaccharidtransport ist ein transzellulärer Transport, der vom Darmlumen durch die Mikrovillimembran in die Epithelzellen und durch das Zytoplasma und über die basale oder laterale Zellmembran in das Blut abläuft. Die Darmepithelzelle zeigt einen deutlichen polaren Aufbau.

Lumenwärts wird die Dünndarmmukosa durch die Mikrovilli begrenzt, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Sie sind etwa 1 µ lang und haben einen Durchmesser von o,1 µ. Im Durchschnitt trägt eine Zelle mehrere hundert Mikrovilli, wodurch die effektive Zelloberfläche um das 2o bis 3ofache vergrößert wird. Die Mikrovilli werden lumenwärts durch drei Schichten, der eigentlichen Plasmamembran, einer aufgelagerten Glykoproteidschicht, die das Mikromilieu um die Mukosazelle bestimmt, abgegrenzt.

Nicht nur die Mikrovilli, sondern die gesamte Zellmembran der Mukosazelle ist von einer Glykoproteidschicht, "Glykokalyx", bedeckt. Sie ist als Kontaktsubstanz für die Verankerung der Mukosazelle verantwortlich. Die Basalmembran ist eine besondere Ausbildung der Glykokalyx bei resorbierenden Zellen. Die Glykoproteide der Glykokalyx enthalten bis zu 50 % Kohlenhydrate in Form von Oligosaccharidketten, die kovalent an eine Peptidkette gebunden sind. Die Glykoproteide stellen eine Art Ionenaustauscher dar, wodurch das Ionenmilieu in unmittelbarer Nähe der Membran beeinflußt werden kann. Die Mukosazellen sind untereinander so fest verbunden, daß das luminale Kompartiment vom serosalen Kompartiment abgeschlossen ist. Die Glykoproteide der lateralen Membran wirken hier adhäsiv, ihre negativen Endgruppen sollen über Ca^{++} in Form von Salzbrücken verbunden sein.

Neuramidase vermindert die Kontaktfähigkeit der Zellen. Manchmal wird der Zellkontakt durch Interdigitation der ge-

genüberliegenden Membran verstärkt.

Unmittelbar unterhalb des Darmlumens sind je zwei aneinandergrenzende Zellen an einer Stelle fest miteinander verschmolzen, der sogenannten "Zonula occludens" oder "tight junction". Hier vereinigen sich die beiden äußeren Lamellen der benachbarten doppelt konturierten Zellmembranen und bilden das elektronenmikroskopische Bild einer dreifachen Kontur. Unterhalb dieser fixen Kontaktstelle kommt es nochmals zu einer festeren Haftung an der Macula adhaerens (Desmosom). Die Demosome sind Membranbezirke von 1 µ Durchmesser mit Verdickungen der Plasmamembran. Von hier strahlen Tonofibrillen in das Zytoplasma ein. Unmittelbar an das Desmosom anschließend folgt der Interzellularspalt, normalerweise 15o - 2oo Å breit, und bis zur Basalmembran durchlaufend. Zur besseren Haftung, möglicherweise auch zur Vergrößerung der Oberfläche, besitzt die seitliche Zellmembran an zahlreichen Stellen ineinandergreifende Verzahnungen, die Interdigitationen. (Ritter, 28).

Das Transportsystem für Monosaccharide und andere Nichtelektrolyte soll sich in der Plasmamembran der Mikrovilli befinden. Als Träger der Transporteigenschaften der biologischen Membran wird Eiweiß angesehen. Bisher ist weder der Transport isoliert, noch die Anordnung in der Membranstruktur bekannt.

Die Lipid- und Proteinanteile der Membran sollen kooperative Wechselwirkungen eingehen. Über ihre Bedeutung beim Transportvorgang sind Vorstellungen von LIEB, STEIN und CHANGEUX (5) entwickelt worden.

Von Bedeutung für den Monosaccharidtransport soll die Anordnung der Disaccharidasen in der Mikrovillimembran sein (SEMENZA). Disaccharide können von der Mikrovillimembran nicht aufgenommen werden, sie müssen vorher von Disaccharidasen gespalten werden. Es gibt zwei Arten von Disaccharidasen. Die festgebundenen Disaccharidasen sollen außer der Hydrolase eine Transferasefunktion haben und die freigesetzten Monosaccharide direkt auf das Transportsystem übertragen. Über den Monosaccharidtransport durch die Mukosazelle ist bisher nichts bekannt. Wie auch andere Zellen, enthalten die Mukosazellen die übrigen Zellbestandteile,

wie Zellkern, Golgi-Apparat, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum. Daraus ergibt sich der funktionelle Zusammenhang zwischen der Struktur und der Funktion der Mikrovilli.

An die apikale Membran des Dünndarmepithels strömen vorwiegend Disaccharide und Dipeptide. Durch membranständige Enzyme werden diese Substanzen an den Mikrovillimembranen zu einfachen resorbierenden Einheiten abgebaut. Dabei spielt wahrscheinlich der "surface coat" direkt auf der Zellmembran eine Rolle.

Dem Bürstensaum wird über die reine Oberflächenvergrößerung hinaus eine zentrale Stellung bei der Resorption eingeräumt. Die Mikrovilli schaffen zwischen sich einen Raum, in dem ein besonderes Milieu herrscht. Dieser Raum wird auf der einen Seite durch den "surface coat" begrenzt, auf der anderen durch die apikale Zellmembran. An den engstehenden Mikrovilli laufen enzymatische Prozesse und Resorptionsvorgänge ab. Hier ist also zwischen dem eigentlichen Darmlumen und der Epithelzelle noch ein besonderes Kompartiment eingeschaltet, das die Resorptionsvorgänge abschirmt, erleichtert oder erst ermöglicht.

Am entgegengesetzten Pol weist die Mukosazelle eine etwa 4oo Å dicke Basalmembran auf, die gleichzeitig die Grenze und den Übergang vom Epithel zum darunterliegenden lockeren Bindegewebe mit seinen Blut- und Lymphkapillaren bildet. Zwischen Basalmembran und Kapillare liegen einzelne Fibrillen oder Bündel aus 4 - 15 Einzelfibrillen mit unregelmäßigem Verlauf. Die Fibrillen sind 2oo - 350 Å dick und haben entweder eine typische Querstreifung von durchschnittlich 640 Å Länge oder aber zeigen eine sogenannte kontinuierliche Querstreifung mit einer 220 Å Periodik (RITTER, 28).

Daneben kommen auch dünne Filamente ohne Querstreifen einzeln oder in kleinen Bündeln vor, die häufig in die Basalmembran einstrahlen.

Über die Bedeutung der Basalmembran für den Monosaccharidtransport liegen keine substantiellen Befunde vor.

Abb. 1

Abb. 2

(Abb. 1) Übersichtsbild vom einschichtigen Zottenepithel der Ratte, in Zottenmitte.
(aus: Verh. Dtsch. Ges. Path. Fischer, Stuttgart, 1969)
(Abb. 2) Elektronenmikroskopischer Aufbau des Dünndarmepithels (schematisch).
(aus: Z. ges. exp. Med. 150, 239-250, 1969)
Die in der Abbildung 1 benutzten Zeichen bedeuten:
L Lumen, BS Bürstensaum, N Kern, Mitochondrienanhäufungen, M einzelne Mitochondrien, x freie Ribosomen, K_1 Kapillaren mit Erythrozyten, K_2 Kapillaren mit Leukozyten.

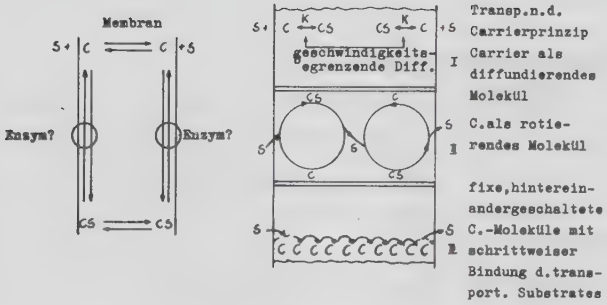
2. Hypothesen über den Nichtelektrolytentransport durch Membranen

Erleichterte Diffusion

Beim Transport von Nichtelektrolyten durchläuft das transportierte Substrat drei charakteristische Prozesse:

1. die spezifische Bindung an einen Membranbestandteil außerhalb der Zelle
2. die Bewegung durch die Membran
3. die Ablösung des Stoffes von der Membran innerhalb der Zelle.

Als Denkmöglichkeit für den Mechanismus des Nichtelektrolytentransportes wurde das Modell eines mobilen Carriers vorgeschlagen (WILLBRANDT, LE FEVRE, 22). Das Substrat "S" reagiert spezifisch auf der ersten Membranseite mit dem Träger "C" und der gebildete Komplex "CS" passiert die Membran. Die Membranpassage kann nach der einfachsten Methode, durch Diffusion erfolgen. "CS" wird auf der anderen Seite gespalten. "S" tritt in die wässrige Phase über, und der freie Carrier "C" kehrt in der Membran durch Diffusion zur Seite 1 zurück.



Das gezeigte System bewirkt den Nettotransport nur bis zum Konzentrationsausgleich. Solange $S_1 = S_2$ ist, besteht in der Membran ein Gradient für CS und ein Gegengradient für C. Beide Gradienten verschwinden, wenn $S_1 = S_2$ ist. Die Reaktion des Substrates mit dem Carrier kann nach der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik formuliert werden:

$$K = \frac{(C) \times (S)}{(CS)}$$

Unter diesen Voraussetzungen würden sich für den Nichtelektrolytentransport analog zur Enzymkinetik folgende Aussagen ableiten lassen:

Im einfachen Fall des Reaktionsgleichgewichts bestehen für S_1 und S_2 folgende Beziehungen:

$$V = D'C_t \left(\frac{S_1}{S_1 + K_m} - \frac{S_2}{S_2 + K_m} \right)$$

$$V = V_{max}K_m \left(\frac{S_1 - S_2}{(S_1 + K_m)\quad(S_2 + K_m)} \right)$$

Dabei bedeuten

K_m - MICHAELIS-Konstante des Träger Substrat-Komplexes CS, V_{max} - Maximalgeschwindigkeit, C_t - gesamte Trägerkonzentration, und D' - Permeabilitätskonstante des Komplexes.

Die Steigerung der Transportgeschwindigkeit durch eine katalysierte Reaktion gegenüber der freien Diffusion hängt von verschiedenen Faktoren ab.

1. vom Ausmaß der Bildung des Carrier-Substrat-Komplexes,
2. vom Verhältnis der Reibungskoeffizienten (des Diffusionswiderstandes) der freien Komponente und des Substrat-Carrier-Komplexes,
3. vom Konzentrationsgradienten des Substrat-Carrier-Komplexes über die Zellmembran.

Das ergibt als Transportgleichung:

$$V = RxT \quad \frac{1}{f_{CS}} \times \frac{[C_I]}{x} \times \frac{K([S_I] - [S_{II}])}{(K + [S_I])\,(K + [S_{II}])}$$

V geht gegen V_{max}, wenn der Sättigungsunterschied des Carriers an beiden Seiten der Membran einen maximalen Wert erreicht

$S_I \gg K \gg S_{II}$, so folgt:

$$\frac{K \times [S_I] - [S_{II}]}{(K + S_I)\,(K + S_{II})} \approx 1$$

und

$$V = Rx\ Tx\ \frac{1}{f_{CS}} \times \frac{(C_I)}{x} = V_{max}$$

Aus Gleichung (1) ist ersichtlich, daß der Nettotransport als Differenz zweier unidirektionaler Fluxe angesehen werden kann.

So folgt:

Influx: $V_{max} \times \frac{[S_I]}{K + [S_I]}$ Efflux: $V_{max} \times \frac{[S_{II}]}{K + [S_{II}]}$

LE FEVRE hat mit markierten Substraten nachgewiesen, daß die Geschwindigkeit der unidirektionalen Fluxe wesentlich größer

ist als die des Nettotransportes. Der Konzentrationsausgleich ist ein dynamischer Zustand (Influx = Efflux).

Die Symbole bedeuten:

S = transportiertes Substrat, C = Membranbestandteil (Carrier), c_t = totale Carrierkonzentration (c_t = C + CS), CS = Substrat-Carrierverbindung, K = Dissoziations- bzw. Affinitätskonstante, V = Transportgeschwindigkeit, V_{max} = maximale Transportgeschwindigkeit, X = Membrandicke, f_{CS} = Reibungskoeffizient des Substrat-Carrier-Komplexes, R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur.

Die Indices I und II beziehen sich auf die Außen- und Innenseite der Membran.

Dieser Transportmechanismus der erleichterten Diffusion ist durch folgendes charakterisiert:

1. Die Transportgeschwindigkeit ist größer als nach den Gesetzen der freien Diffusion zu erwarten wäre.
2. Die Transportgeschwindigkeit ist nicht proportional der Konzentration, sondern folgt einer Sättigungskinetik.
3. Die erleichterte Diffusion zeichnet sich durch hohe Spezifizität aus. Der Transport kann durch strukturanaloge Verbindungen kompetetiv gehemmt werden.
   (Enzyminhibitoren wirken als Hemmstoffe).

Als Argument für einen mobilen Carrier werden u.a. die unidirektionalen Fluxe und die Erscheinung des Gegentransportes oder die Austauschdiffusion gewertet.
(Unter "Gegentransport" wird ein Transport verstanden, der bergauf erfolgen kann und der nicht von der Konzentrationsdifferenz des transportierten Substrates getrieben wird, sondern von der gleichzeitigen Bewegung eines zweiten Substrates für den gleichen Träger in der Gegenrichtung.)

Bei dem dargelegten Mechanismus der erleichterten Diffusion wirkt die Konzentrationsdifferenz von S als treibende Kraft für die Durchtrittsreaktion.

Als treibende Kräfte des Molekültransportes durch die Membran kommen ganz allein für die Durchtrittsreaktion und für folgende chemische Potentiale in Frage:

1. Konzentrations- bzw. Aktivitätsdifferenz der betreffenden Teilchenart über die Membran,
2. der Konzentrationsgradient einer anderen Teilchenart,
3. und das chemische Gruppenübertragungspotential, eine in der Membran ablaufende chemische Reaktion.

Die formale Beschreibung eines Fluxes I_i und seine Kopplung durch die betreffenden chemischen Potentiale ist durch folgende Gleichung möglich:

$$A^i = \underbrace{Rii \cdot A}_{A} + \underbrace{RijIj}_{B} + \underbrace{RirIr}_{C}$$

(Ai-Differenz des elektrochemischen Potentials der Teilchenart i über die Membran, Ii-Flux der Teilchenart j durch die Membran, Ir-Ablauf der chemischen Reaktion r in der Membran, Rii, Rij, Rir - Kopplungskoeffizienten zwischen Flux Ji und Ai, bzw. Ij und Ir). Das heißt, bei der erleichterten Diffusion ist auch im Falle eines gekoppelten Transportes eine Substratbewegung gegen das Konzentrationsgefälle möglich und dies erfordert keine Aufnahme freier Energie.

Der gekoppelte Transport:

Als gekoppelte Transporte bezeichnet man Transporte, die an den Flux einer anderen Substanz gekoppelt sind. Das findet man z. B. wenn Wasser auf Grund eines durch Teilchentransport erzeugten osmotischen Ungleichgewichtes mit transportiert wird. Es können aber auch durch einen primären Wassertransport gelöste Substrate mitgeschleppt werden.

Auch der Gegentransport ist ein Beispiel für den gekoppelten Transport. Die Translokation der einen Teilchenart ist gekoppelt mit dem Transport einer anderen in entgegengesetzter Richtung.

Von besonderem Interesse sind gekoppelte Transporte von zwei Substraten in die gleiche Richtung. Monosaccharid- oder Aminosäuretransport in der Darmschleimhaut und im Nierentubulus sind gleichzeitig mit einem erhöhten Na^+ Transport gekoppelt.

Dabei kommt es zur Akkumulation von Monosacchariden oder Aminosäuren in den betreffenden Zellen. Diese Form des gekoppelten Transportes verlangt die Zufuhr von Stoffwechselenergie entweder zur Aufrechterhaltung des Na^+-Gradienten oder aber deshalb, weil es sich beim Nichtelektrolytentransport um einen echten aktiven Transportprozess handelt.

Der aktive Transport

Dies ist ein Transportvorgang, der unter Aufwendung von Energie aus dem Stoffwechsel auch gegen das elektrochemische Potential abläuft. Für den aktiven Transport haben alle Gesetzmäßigkeiten der carriervermittelten Diffusion Gültigkeit. Im Gegensatz dazu wurde als Energiequelle für aktive Transporte das ATP anerkannt. Eine spezifische ATPase überträgt das Potential des ATP auf das Transportsystem. Daher muß bei allen aktiven Transporten ein Wechsel kovalenter Bindungen eintreten, wohingegen bei allen nichtaktiven Transportformen nur schwächere Wechselwirkungskräfte ausgetauscht werden. Damit wird die Beziehung zwischen den Transportprozessen und chemischen Reaktionen hergestellt. MIT CHELL (24) kennzeichnet den aktiven Transport so:

1. Es sind an enzymatische Reaktionen gebundene Transporte. Der Bindungswechsel erfolgt im energieübertragenden Anteil des Gesamtprozesses. Das transportierte Substrat ist unbeteiligt, es findet z.B. ein Na^+- K^+ – ATPase abhängiger Ionentransport statt.

2. Der kovalente Bindungswechsel könnte zwischen dem transportierten Substrat und dem Carrier erfolgen. Steady State liegt in diesem System vor, wenn $J_{12} = J_{21}$ ist, also

$$\frac{[S_1]}{K_{T_1} + [S_1]} = \frac{[S_2]}{K_{T_2} + [S_2]}$$

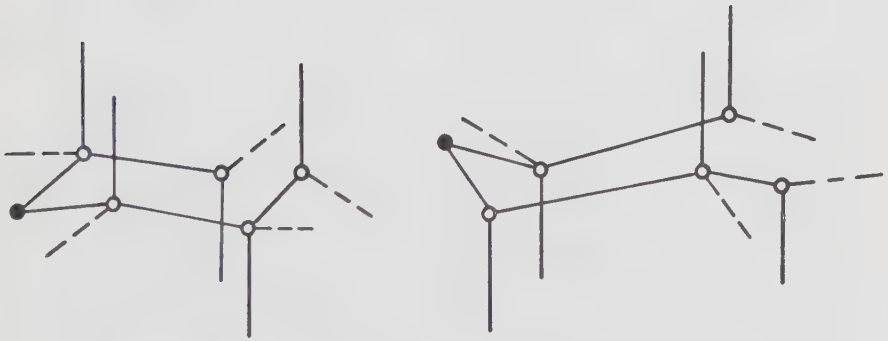
Die Akkumulationsrate beträgt: $\frac{[S_2]}{[S_1]} = \frac{K_{T_2}}{K_{T_1}}$

Für die Bildung eines spezifischen CS-Komplexes mit Monosacchariden auch an der Darmschleimhaut könnten folgende Befunde sprechen:

Beobachtungen der Strukturspezifitäten zeigten das unterschiedliche Verhalten der Aldosen und Ketosen und die großen Unterschiede in der Penetrationsgeschwindigkeit stereoisomerer Aldosen, besonders der optischen Antipoden gleicher Zucker.

Wie für Erythrozyten gilt auch für die Mukosazelle, daß bei Aldosen an Menschenerythrozyten die C_1-Konfiguration des Pyranoseringes die für den Transport günstigste Konfiguration darstellt (LE FEVRE (22).

Bei den von LE FEVRE und MARSHALL diskutierten experimentellen Untersuchungen der Sesselkonformationen C_1 und $_1C$, stellt C_1 die günstigste Transportform dar.



Konformation C_1 Konformation $_1C$

3. Der gekoppelte Monosaccharid-Na^+-Transport an der Darmschleimhaut und die verschiedenen Transportmodelle

Der Monosaccharidtransport in die Mukosazellen ist dadurch gekennzeichnet, daß der Transport durch die Mikrovillimembran einer Sättigungskinetik folgt, Na^+-abhängig ist, und gegen das Konzentrationsgefälle möglich ist. Bis heute ist es noch nicht gelungen, zu entscheiden, ob der Monosaccharidtransport ein echter aktiver Transport ist, oder einen mit dem aktiven Na^+-Transport über den Na^+-Gradienten und einen mobilen Carrier gekoppelten Transport darstellt.

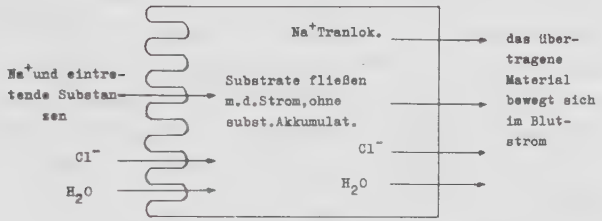
Erste experimentelle Befunde waren die unterschiedlichen Resorptionsgeschwindigkeiten einzelner Zucker (WILLBRANDT). HEDON arbeitete bereits 1900 an Fragen der selektiven Permeabilität. 1925 entdeckte CORI (9), daß Fruktose bei der Resorption eine Sonderstellung einnimmt. Sie wird schneller resorbiert als die "passiven Zucker", ist aber nicht Na^+-abhängig und ohne Akkumulation in der Mukosazelle, aber ihre Resorptionsgeschwindigkeit entspricht der von Glukose. Die charakteristischen Merkmale des aktiven Transportes fehlen, die Carrierkinetik war noch nicht bekannt.

VERZAR (37) und Mitarbeiter fanden 1936, daß die selektive Resorption durch Zyanid, Jodazetat, Phlorrhizin und anaerobe Bedingungen gehemmt wird. VERZAR (37) entwickelte die Theorie der Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Monosaccharide beim Transport durch die Mukosazelle. Er entdeckte, daß sich bei der Resorption von Galaktose, Glukose und Fruktose in der Mukosa Hexosephosphate anhäufen. Heute muß diese Hypothese abgelehnt werden. Einen neuen Akzent gaben 1953 die Arbeiten von FISCHER und PARSONS (25). Sie wiesen nach, daß der Galaktose- und Glukosetransport in der Darmschleimhaut einer MICHAELIS-MENTEN-Kinetik folgt. Das führte zur Annahme eines Carriermechanismus für den Monosaccharidtransport. Ein wichtiger Aspekt dabei war die Na^+-Abhängigkeit.

Eine zusammenfassende Hypothese über den Mechanismus des Monosaccharidtransportes wurde von CRANE (12) entwickelt.

3.1 Die Hypothese von CRANE über die Interaktion zwischen Na^+- und Zuckertransport

CRANE geht von der Na^+-Abhängigkeit aus, vom Transport gegen einen Gradienten, der Selektivität und der Sättigungskinetik. Experimente an in vitro-Präparationen zeigten die Akkumulation des Zuckers in die epithelialen Zellen.



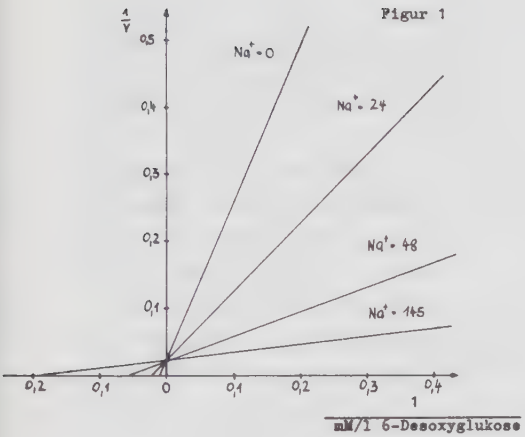
Weiterhin ist an in vitro-Präparationen nachzuweisen, daß ein substratspezifischer Na^+-abhängiger und energieabhängiger Prozess existiert, der schnell das Zuckergleichgewicht zwischen Zellen und dem Medium herstellt. Er postulierte, daß Zucker und Na^+ an einem gemeinsamen Carrier durch die Zellmembran transportiert werden, durch die Affinität der Monosaccharide in Abhängigkeit von der Na^+-Konzentration. Die Asymmetrie der Na^+-Verteilung führt zur "bergan-Akkumulation" des Zuckers, weil die Reaktionsgeschwindigkeit $C + S \rightleftharpoons CS$ damit von der Na^+-Konzentration des Mediums abhängt. Extracellulär (in vivo-Darmlumen) ist die Na^+-Konzentration höher als intracellulär. Intracellulär dissoziert der Komplex infolge der geringeren Na^+-Konzentration, die durch den aktiven energieverbrauchenden Na^+-Efflux aufrechterhalten wird.

Der dafür erforderliche Na^+-Gradient wird durch die Wir-

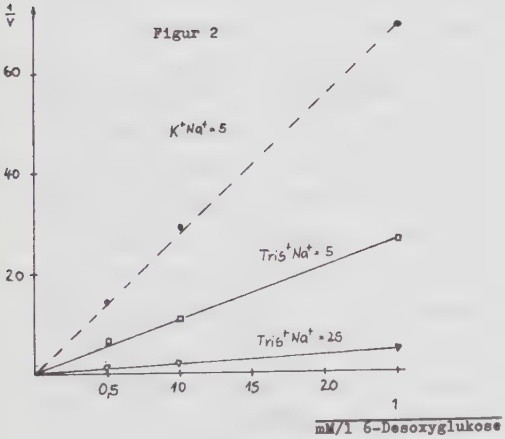
kung einer nach außen gerichteten energieabhängigen Na^+-Pumpe, die an einem anderen Ort in der gleichen Membran vorhanden ist, aufrechterhalten. Die Annahme wurde dadurch gerechtfertigt, daß eine Na^+ und K^+ abhängige ATPase in der Mukosazelle vorhanden ist. Übereinstimmend mit den gefundenen Resultaten sieht CRANE (10) den Zuckertransport als eine Funktion der Na^+- Konzentration des Mediums an.

Nach der Hypothese wies CRANE nach, daß K^+ und verwandte Ionen den Zuckertransport hemmen. In der Gegenwart von verschiedenen K^+- und Tris-Konzentrationen zeigt sich, daß Na^+ durch K^+ vom Transportsystem verdrängt wird. Er deutet es so, daß K^+ mit Na^+ um die spezifische Kationenbindungsseite am Zuckerträger konkurriert. Dadurch wird die Affinität des Zuckers intracellulär zusätzlich herabgesetzt.

Als zusätzliche Befunde zur Klärung der Hypothese versuchte SALOMON (31) den Gegentransport an in vitro-Versuchen mit Rattendarm zu zeigen. Er konnte beweisen, daß die Zufügung eines zweiten Substrates in ein im Gleichgewicht befindliches Substrat zum Efflux in das Medium führt, gegen seinen eigenen Konzentrationsgradienten. Aus dem "bergab"-Gradienten des Na^+ in die Zellen resultiert die "bergan"-Bewegung des Zuckers in der gleichen Weise. Die Akkumulation von Substrat ist abhängig vom "bergab"-Gradienten des Na^+ in die Zellen und von der Interference durch die hohe intracelluläre K^+-Konzentration mit Na^+-Carrier Interaction. Im steady-state ergibt sich eine Akkumulationsrate des Zuckers im Verhältnis seiner extra- und intracellulären Halbsättigungskonstanten.



Die Figur 1 zeigt die Abhängigkeit der Höhe des 6-Desoxyglukose-transportes von der Konzentration von 6-Desoxyglukose und Na^+. Der scheinbare K_m ist über 2oo-fach gestiegen im Vergleich zu Na^+ von 145 mEq/l zu Null.



Die Figur 2 zeigt den Vergleich der kinetischen Konstanten des 6-Desoxyglukose-Transportes mit $Tris^+$ oder K^+ als Ersatz für Na^+. Die offenen Symbole sind $Tris^+$, die gefüllten Symbole gelten für K^+. Die Na^+-Konzentrationen sind folgende:

25 mEq/l und =5 mEq/l

(beide Figuren nach CRANE, FORSTNER und EICHHOLZ (13)).

Der K_m wurde experimentell durch Messung der Zuckerakkumulation bestimmt. Ähnliche Eigenschaften weist das System auf, wenn anstelle der Akkumulation das transmurale Potential gemessen wurde (LYON und CRANE).

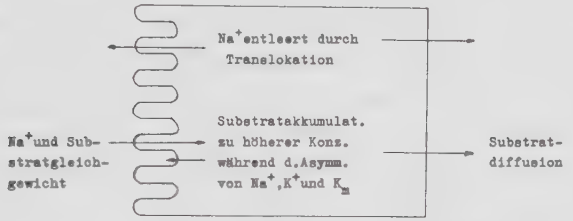
CRANE ist der Meinung, daß bei Sättigung des Carriers mit Na^+ die Affini-tät für die Monosaccharide maximal ist, so daß der K_m-wert klein ist. Im Gegensatz dazu würde der komplette Ersatz von Na^+ durch K^+ erwarten lassen, daß die Affinität zum Zucker sinkt und der K_m sehr steigen wird. Die Werte der Affinität können als Ergebnis der Gegenwart der verschiedenen Na^+-K^+- Konzentrationen betrachtet werden.

Es wurde gefunden, daß je niedriger die Konzentration des Substrates in dem Medium ist, desto höher wird das Verhältnis Gewebe/Medium Konzentrationen im Gleichgewicht sein. Na^+ hat offensichtlich keine Wirkung, wenn die Substratkonzentration sehr hoch ist. Wenn die Na^+ Konzentration in dem mukosal inkubierten Medium tiefer liegt als jener in der Zelle, wird das Gleichgewicht zwischen Gewebe/Medium im Verhältnis unter 1 eingestellt. Für die Bewegung des Substrates zeigten MITCHEL (24), ROSENBERG und Wilbrandt (29) drei Asymmetrien, die den Na^+-abhängigen Transport treiben können:

1. Der innere "bergab" Na^+-Gradient, der effektiv ist, weil die Zahl der Carrierbewegung von der Wechselwirkung mit Na^+ abhängig ist.
2. Der äußere "bergab" K^+-Gradient, weil das intracelluläre K^+ sich in die Na^+ Interaktion einmischen würde, für die nach außen gerichtete Bewegung des Carriers.
3. Der Gradient der Substrat-Carrier Affinität, der fordert, daß das Gleichgewicht im Gewebe/ Medium Substratverhältnis größer als 1 eingestellt wird.

Alle drei Asymmetrien hängen letztlich von der Zellstoffwechselenergie ab. Es sind gerichtete chemische Potentiale. Das Na^+ abhängige Monosaccharidtransportsystem selbst ist

aber ein Gleichgewichtssystem, das sich nach chemischen Potentialen einstellt, wie Hemmstoffe es zeigen. In Studien über den Glukosetransport z.B. nahm CRANE an, daß Quabain die Glukoseakkumulation hemmt, weil es die Na^+ Pumpe und die Na^+ Entleerung hemmt. Der Angriffspunkt von Quabain wurde am aktiven Na^+-Efflux vermutet. Der Glukosegradient würde sehr viel geringer sein.



Bei der Bereitstellung von Zellstoffwechselenergie gibt es Differenzen zwischen in vitro- und in vivo-Testsystemen. Blutglukose ist der Nährstoff für in vivo-Testsysteme.

Dadurch bedingt, variiert die Asymmetrie in Abhängigkeit von den Stoffwechselbedingungen und mit den Substraten. Zwei fundamentale Annahmen sind in dem Modell vereinigt:

1. Jede Asymmetrie in der Zuckerverteilung, die an der Zellmembran erzeugt werden kann, ist das Ergebnis einer entgegengesetzten Asymmetrie der Na^+ -Verteilung. Die Energie zur Erzeugung des Zuckergradienten wird aus der Energie des aufgestellten Na^+-Gradienten erhalten.
2. Die Zufuhr von Stoffwechselenergie, die das System benötigt, erscheint nur auf der Seite der Na^+-Ausschleusung. Eine direkte Energiezufuhr auf den Zuckerträger selbst erfolgt nicht. Zusätzlich zu diesen zwei Aspekten postuliert das Modell weiterhin, daß eine aktive Zuckeraufnahme auch bei fehlender Stoffwechselenergiezufuhr möglich sein müßte, wenn der normale Na^+- Gradient aufrecht erhalten

wird. Wenn das Modell von CRANE funktionell richtig ist, müßte eine Umkehr des normalen Na^+-Gradienten eine aktive Zuckerausschleusung bewirken.

Das Modell KIMMICHS zur Kopplung des Na^+ und Nichtelektrolytentransportes und seine Experimente dazu

Jedes Modell für den Monosaccharidtransport durch den Dünndarm muß die Sättigungskinetik, Na^+- Abhängigkeit und die Akkumulation gegen einen Gradienten berücksichtigen.

Im Modell von KIMMICH (20) wird besonders eine Klärung des Mechanismus für die Kopplung zwischen Stoffwechselenergie und Monosaccharidakkumulation versucht.
Untersuchungen waren auf die gekoppelten Änderungen der Energiebereitstellung in der Zelle und des Nichtelektrolytentransportes gerichtet.
Dazu zählen:

1. Beziehungen zwischen ATP-Gehalt und Nichtelektrolytakkumulation,
2. Beziehungen zwischen Glykolyse und Monosaccharidtransport,
3. die Einwirkung von Quabain und anderen Herzglykosiden auf den Monosaccharidtransport,
4. Untersuchungen über die direkten zeitabhängigen Beziehungen zwischen dem Ionen-Gradienten- und Nichtelektrolytentransport,
5. Stöchiometrie und Übereinstimmung zwischen Na^+ und dem Transport von Zucker und Aminosäuren,
6. Beziehungen zwischen dem Nichtelektrolytentransport und dem Kaliumtransport. Untersuchungen in der gleichen Richtung wurden von KIMMICH durchgeführt.

An isolierten Epithelzellen des Kü kendünndarms hat er gezeigt, daß selbst bei Umkehr des normalen Gradienten der Zuckertransport in die Zelle mit gleicher Geschwindigkeit,

in gleichem Maß weitergeht. Die intracelluläre Natriumkonzentration wurde dabei durch Inkubation in Na^+ -freie oder Na^+ -reiche Lösungen eingestellt.
Nach dem CRANE Modell wäre eine stark verminderte Galaktose-Aufnahme bei den Na^+- haltigen Zellen (besonders bei den niedrigeren Na^+- Konzentrationen außerhalb der Zelle) und ein Fehlen der aktiven Aufnahme besonders zur Wiederherstellung eines einwärts gerichteten Na^+- Gradienten zu erwarten gewesen. Phlorrhizin wurde zur Bestimmung des Gleichgewichtspunktes im Zuckergehalt zwischen Medium und Zellwasser benutzt. Die Ergebnisse zeigten, daß aktive Galaktoseaufnahme in jeder Situation bereits innerhalb 1 Minute nach Versuchsbeginn stattfand.
In einem anderen Versuch wurden die Zellen mit 2,5 mmol ^{14}C-3-O Methylglukose (3-OMG) und 8o mmol NaCl beladen und anschließend in ein Na^+-freies Medium gegeben, das o,8 mmol ^{14}C-3-OMG der gleichen spezifischen Aktivität enthielt. Das extracelluläre Na^+ und die 3-OMG fielen auf 2o bzw. 1,25 mmol. Nach der Na^+-Gradienthypothese würde man einen initialen Verlust von Zucker aus der Zelle erwarten, sowohl durch Diffusion als auch durch aktive Ausstoßung auf Grund des umgekehrten Na^+- Gradienten. Wenn aber die Energiezufuhr für die Zuckerspeicherung direkt und unabhängig vom Na^+-Gradienten erfolgt, wäre eine Zuckerspeicherung entgegen einem Konzentrationsgradienten zu erwarten. Die Meßwerte zeigten, daß die Zellen tatsächlich bereits bei der ersten Probenentnahme Zucker speichern.

Die Hemmung durch Kalium ist charakteristisch für Stofftransporte von intakten Dünndarmpräparationen (CSAKY, 1963, (14), BOSACKOVA (3), CRANE, 1965, (12). Sie deutet auf eine Hemmung der Na^+, K^+ - ATPase hin, die auch durch K^+ hemmbar ist. Eine Beobachtung, die mit der Na^+-Gradienthypothese unvereinbar scheint, ist das schlagartige Einsetzen der Hemmung der Zucker- und Aminosäureakkumulation durch Quabain. Der Hypothese entsprechend müßte der Nichtelektrolytentransport erst dann verhindert werden, wenn der Na^+- Gradient

völlig aufgehoben ist. Deshalb müßte Quabain eigentlich eine Anfangsperiode aktiver Zuckerspeicherung erlauben, bis zu dem Zeitpunkt, an dem sich ein Na^+-Gleichgewicht durch die Zellwand eingestellt hat. Statt dessen wirkt Quabain selbst in so kurzen Abständen wie 30 s als starker Inhibitor für die Galaktoseaufnahme und der kleine Zuckergradient, der erzeugt wird, wird während des gesamten Experimentes aufrechterhalten. Phlorrhizin ermöglicht nur den Zuckereintritt durch Diffusion und die Aufnahme bei Anwesenheit dieses Hemmstoffes gibt einen Bezugswert für die nichtaktive Aufnahme.

Einige Konsequenzen dieser Ergebnisse von KIMMICH sollen hier erwähnt werden.

Die Tatsache, daß eine Zuckerakkumulation in isolierten, stoffwechselintakten Intestinalzellen bei Umkehr des gewöhnlichen Na^+-Gradienten nachzuweisen ist, sind unvereinbar mit der Na^+-Gradient-Hypothese von CRANE. Da die initiale Akkumulation von Galaktose bei allen Na^+-Konzentrationen identisch zu sein scheint, ungeachtet in welche Richtung der Na^+-Gradient gerichtet ist, ist in Frage gestellt, ob überhaupt ein Teil der treibenden Kraft aus den Ionen-Gradienten kommt. Daraus läßt sich schließen, daß eine direkte Energiezufuhr für den Zuckertransport durch einen ATP gespeisten Träger existiert. Eine direkte Kontrolle des Monosaccharidtransportes durch Stoffwechselenergie, nicht über den Gradienten, würde im Einklang mit anderen Transportprozessen z.B. in den Mitochondrien stehen.

KIMMICH postuliert die Einbeziehung der Na^+-K^+-aktivierte ATPase in das Zuckertransportsystem. Nach SKOU, 1965, (35), POST, 1963, (26), SEN (34) und FAHN, 1966, (16), wird die membrangebundene ATPase durch Na^+ und K^+ aktiviert und katalysiert den aktiven Transport dieser Ionen gegen ihre Gradienten über die Zellmembran. Sie konnten zeigen, daß dieses Enzym zwei Intermediate während der Katalyse der ATP-Hydrolyse

erzeugt, die man für die Energieübertragung zum Ionentransport für wichtig ansieht. Beide Intermediate sind phosphoryliert, und stellen wahrscheinlich einen energiereichen Komplex in verschiedenen Konformationen dar (SEN, 1969, (34), FAHN, 1966, (16). Der erste wird vom ATP und einem freien Enzym (E) in einer Na^+ und Mg^{++} abhängigen Reaktion aus ATP erzeugt, während höhere Mg^{++}-Spiegel zu einer Überführung von E_1-P zu E_2-P führen. Oligomyzin hemmt die Aktivität der Na^+ und K^+- ATPase und steigert den Na^+-abhängigen Umwandlungsprozess von ATP in ADP und so könnte seine Wirkung die Umwandlung zwischen den beiden phosphorylierten Intermediaten verhindern. Quabain scheint verschiedene Angriffspunkte zu haben, indem es sich mit den beiden freien Enzymen oder dem E_2-P-Komplex verbindet. Das K^+-Ion führt zu einer Hydrolyse des zweiten Intermediaten und auf einem unbestimmten Weg kann die Hydrolyseenergie für den monovalenten Ionentransport nutzbar gemacht werden (SEN, 1969, (34), FAHN, 1966, (16).

Unter Berücksichtigung der einzelnen Ergebnisse lassen sich interessante Beziehungen zum Monosaccharidtransport herstellen.

Dafür hat KIMMICH folgendes Modell vorgeschlagen:

Die Hauptprämisse des Modells beruht auf der Annahme, daß Energie, die dem E_2-P-Komplex innewohnt, gleichzeitig für den monovalenten Ionen- oder Zuckertransport genutzt werden kann.

Das oben Erwähnte schließt ein, daß das E_2-P-Intermediat auch Energie für die Aminosäurespeicherung liefern kann, was im Einklang mit der Ähnlichkeit der Eigenschaften der beiden Transportsysteme steht (SCHULTZ, 1967, (33), FOX, 1964, (17), INUI (19) und CHRISTENSEN, 1966, (19), WHEELER und CHRISTENSEN (36), 1967, CSAKY, 1961, (14), CURRAN, 1965, (15), SCHULTZ und CURRAN, 1969, (32).

Da sowohl der Monosaccharid- als auch der Ionen- und

Aminosäuretransport von der Bildung eines Intermediats abhängig ist, muß erwartet werden, daß zwischen Ionen- und Nichtelektrolytentransport kompetetive Effekte auftreten, ebenso zwischen Aminosäure- und Monosaccharidtransport. Außerdem würden diese Transportprozesse gemeinsam gegenüber jenen Faktoren empfindlich sein, die die Bildungsrate von E P beeinflussen. Deshalb ist der Zuckertransport Na^+ und Mg^{++}- abhängig und wird durch Quabain oder Oligomyzin genauso wie der monovalente Ionentransport gehemmt. Da Quabain und Oligomyzin direkt auf die Energiezufuhr für die Zuckerspeicherung wirken, sind sofortige Hemmwirkungen dieser Wirkstoffe zu erklären.

KIMMICH zeigt 1970, daß Phlorrhizin die Aminosäurespeicherung steigert, was eine weitere Stütze dafür ist, daß ein gemeinsames Intermediat bei Hemmung des Zuckertransportes allein für den Aminosäuretransport zur Verfügung stehen würde. Die gegenseitige Hemmung von Aminosäuren und Zuckern stellt daher eine Konkurrenz um einen energiereichen Intermediaten und nicht um einen multifunktionellen Träger dar (ALVARADO (1), 1966).

Das Natrium-Gradient-Modell schreibt eine enge Stöchiometrie zwischen aktivem Zuckereintritt und dem gekoppelten Na^+- Eintritt vor. Die Funktion des Zuckerträgers bei der aktiven Speicherung basiert darauf, daß er mit Na^+ beladen sein muß. Es weisen aber viele Daten darauf hin, daß die Monosaccharid-Natrium-Stöchiometrie variabel sein kann (SCHULTZ) (33), 1967, SCHULTZ und CURRAN (32), 1969). Es existiert eine Proportionalität zwischen Na^+- und Zuckereinstrom, da das Ausmaß der Akkumulation bestimmt, wieviel Energie dem Ionentransport entzogen wird, so daß es zum Zusammenbruch des Na^+- Gradienten kommt. Ebenso müßte man einen teilweisen Zusammenbruch des Kaliumgradienten während des Zuckertransportes erwarten. Unter diesen Bedingungen müßte folglich K^+ aus der Zelle austreten. Wenn dagegen das Na^+-Gradient-Modell korrekt wäre, müßte man im Gegensatz dazu einen zuckerinduzierten Kaliumein-

strom erwarten, da die Na^+- Pumpe schneller arbeiten müßte, um das mit dem Zuckerträger hereingebrachte Na^+ auszustoßen.

Es ist bedeutsam, daran zu erinnern, daß die Na^+-K^+ - aktivierte ATPase Aktivität offensichtlich reversibel ist. GARRAHAN und GLYNN, 1967 (38), zeigten eine Na^+- abhängige Markierung von ATP mit (^{32}P) am Erythrozyten. Das läßt vermuten, daß die energiereichen Intermediate, die für die ATPase-Aktivität von Bedeutung sind, entweder aus ATP oder durch Energie, die aus einem bestehenden Ionengradienten gewonnen wird, gebildet werden können.

Als ein weiterer Diskussionspunkt verbleibt der Angriffspunkt von Na^+ am Transportsystem. Nach KIMMICH (2o) soll es das intracelluläre Na^+ sein, das für den Zucker- und Aminosäuretransport wichtig ist und nicht das extracelluläre. CRANE (12), 1965, und SCHULTZ (32) dagegen nehmen an, daß das extracelluläre Na^+ für den Alanintransport nötig ist. Zur exakten Bestimmung des Angriffspunktes von Na^+ beim Zuckertransport benötigt man weitere Angaben. CSAKY (14) zeigte, daß die Intestinalabschnitte, die zuvor in Mannitol inkubiert wurden, nur langsam ihre Zuckertransportfähigkeit zurückgewinnen, wenn man sie in ein Na^+- Medium bringt. Daraus folgt, daß der Na^+- Angriff nicht extracellulär sein kann. Andererseits soll nach FAUST (16) für die Bindung von Monosacchariden an das Transportsystem Na^+ erforderlich sein. Es kann als ziemlich gesichert gelten, daß ein Anstieg der transmuralen Potentialdifferenz sofort dann auftritt, wenn ein aktiv zu speichernder Zucker und Na^+ mit der Mikrovillimembran in Kontakt kommt. Bisher nahm man als Ursache dieser Potentialänderung eine gesteigerte Asymmetrie der Na^+- Verteilung durch die Epithelschicht an (SCHULTZ und ZALUSKY (33), 1964, LYON und CRANE (11), 1966, QUAY und ARMSTRONG (27), 1969).

IV. Experimenteller Teil:

1. Tiermaterial, Präparation, Inkubation

Als Versuchstiere wurden Ratten aus dem Wistarstamm, mit einem Gewicht von 200 - 250 g verwendet.
Die Tiere wurden 24 h vor Versuchsbeginn auf eine Ernährung mit 5 %iger Glukoselösung gesetzt, um gleiche Ernährungsbedingungen bei allen Tieren zu erreichen und damit einheitliche Voraussetzungen zu schaffen.
Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation. Anschließend wurde über einem Bauchschnitt der gesamte Darm aus der Bauchhöhle eventriert und unter anatomischer Orientierung ein etwa 30 cm langer Anteil des mittleren Jejunum entnommen. Dieser Abschnitt wurde in drei gleich lange, etwa 10 cm messende, Dünndarmsegmente aufgeteilt. Um irreversible Schäden zu vermeiden, wurde die Zeit zwischen Präparation und Inkubation kurz gehalten. Der Dünndarm durfte nicht unterkühlt werden und mußte während der Präparation in temperiertem, begastem und körperähnlichem Milieu aufbewahrt werden.
Jedes dieser Darmsagmente wurde vorsichtig evertiert und in das Inkubationsgefäß gebracht, nachdem er zwischen zwei Glasrohre mit einem Durchmesser von 4 mm eingespannt worden war. Der Darm wurde von KREBS-HENSELEIT-Puffer umspült, der durch den Thermostaten auf einer konstanten Temperatur von 37°C gehalten wurde und mit Carbogen begast wurde. Zur Gewänrleistung der Zirkulation des Puffers an der serosalen Seite wurde noch eine Peristaltik-Miniflow-Pumpe angeschlossen. Dadurch wurde die vom Darm transportierte Glukose in einen Auffangbehälter weitergeleitet. Die Geschwindigkeit der Pumpe konnte auf die Transportleistung des Darmes eingestellt werden. Das durchströmende Volumen mußte so groß sein, daß die Glukosekonzentration photometrisch mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden konnte. Da wir alle 10 Minuten absaugten, erhielten wir ein durchschnittliches Volumen von 1,7 ml, in dem die Glukosekonzentration für eine photometrische Bestimmung genügend hoch war. Das transmurale Potential wurde abgeleitet durch eine Elektrode, die sich im mukosalen Kompartiment befand und eine Elektrode, die mit Hilfe einer Agarbrücke

im serosalen Kompartiment lokalisiert war. Darmsegmente an denen nach Einspannen in die Meßapparatur keine Potentiale abgeleitet werden konnten, mußten verworfen werden, da diese Darmsegmente bereits avital waren.
Als Monosaccharid wurde 10 mM Galaktose verwendet. Zur Hemmung des Galaktosetransportes in der Mukosazelle wurden 2,4- Dinitrophenol (2,4-DNP), Monojodessigsäure und Phlorrizin verwendet.

2. Meßtechnik

Zur Untersuchung des Monosaccharid-induzierten Potentials erarbeiteten wir uns eine Apparatur, um die transcelluläre Potentialdifferenz an in vitro-Präparaten zu erfassen. Dabei war zu beachten, daß Mikroelektroden an das Objekt anzupassen waren. An Elektroden wurden Kalomelelektroden (unpolarisierbare Elektroden) verwendet, die sich im biologischen Milieu durch Gleichartigkeit und Unveränderlichkeit auszeichnen.
Zur Verstärkung wurde zwischen die Elektroden, die die Darmpotentiale abgreifen und den Kompensationsschreiber ein Gleichspannungsverstärker REV 2 geschaltet. Im eigentlichen Sinne arbeitete der REV 2 nicht als Verstärker, sondern als Impedanzwandler, da die Spannungsverstärkung gleich 1 war. Der hohe komplexe Widerstand, zwischen Elektrode und in vitro-Präparat wurde an den niedrigen Widerstand des Schreibers angepaßt. Zur Registrierung und Objektivierung unserer Meßergebnisse verwandten wir einen Kompensationsbandschreiber. Der Schreiber arbeitete nach dem Prinzip der Spannungskompensation nach dem Potentiometerverfahren. Es müßte berücksichtigt werden, daß die Zellen und die Mikroelektroden einen hohen Innenwiderstand haben. Aus diesem Grunde war es notwendig, eine hochohmige Messung durchzuführen, um genaue Meßergebnisse zu erhalten. Daraus ergibt sich das Verhältnis:

$$\frac{U_M}{U_o} = \frac{R_1}{R_i} \qquad UM = Uo \cdot \frac{R_1}{R_i}$$

Wenn $U_M = U_o$ und $R_1 = R_i$ sind, sind die Widerstände angepaßt.Nur wenn R_1, der Widerstand der Meßapparatur, sehr hoch ist und sich mit R_i, dem Widerstand in der Membran anpaßt, kann die abgegriffene Spannung U_M der wahren Spannung U_o genähert werden. Da mit lebendem Gewebe gearbeitet wurde, mußte eine milieuähnliche Umgebung für die Zellen und eine Begasungseinrichtung geschaffen werden. Es galt, das biologische Milieu zu simulieren, um richtige Meßergebnisse zu erzielen. Zur Verwirklichung der Anforderungen des tierischen Objektes, zur Erhaltung der Körpertemperatur, war es notwendig, einen Thermostaten (Ultrathermostat Typ U 10) in die Apparatur einzuschalten. Zu berücksichtigen war weiterhin die Herstellung eines biologischen Milieus für lebende Gewebe. Dabei spielte die Begasung mit Carbogen (5 atm, 5 % CO_2, 95 % O_2) eine große Rolle. Die "physiologische Salzlösung" von KREBS-HENSELEIT eignete sich sehr gut als Spüllösung. Sie stellt in bezug auf anorganische Salze ein dem Säugetierserum adäquates Medium dar.

Da sich die nachzuweisenden Potentialdifferenzen in Geweben meist in der Größenordnung von $1o^{-3}$ Volt bewegen, und die Vorgänge an der Plasmamembran sehr rasch ablaufen, mußte man hochempfindliche und schnell reagierende Meßinstrumente einsetzen. Mit dieser Meßapparatur wurden einheitliche Versuchsbedingungen unter Berücksichtigung der Anforderungen eines biologischen Materials gewährleistet.

3. Berechnung der Ergebnisse

Im ersten Teil der Versuche wurden monosaccharid-induzierte Potentiale und der Galaktosetransport am Dünndarm gemessen. Zu den Darmsegmenten wurden 10 ml Galaktose gegeben und die sofort nach Versuchsbeginn abzuleitenden Potentiale und der Galaktosetransport über 1 Stunde gemessen. Die zu den angegebenen Zeiten gemessenen Werte sind in den Tabellen 1 - 6 enthalten. Dabei sagt die Tabelle 1 etwas über

die Potentiale in mV aus.
Tabelle 1 a zeigt die Differenzen zwischen den einzelnen Zeitpunkten und Tabelle 1 b gibt die relative Häufigkeit in % zu den angegebenen Zeiten wieder. Der nach 60 Minuten erreichte Wert des Galaktosetransportes wurde 100 % gesetzt.

Wie aus den Abbildungen ersichtlich ist, steigen schon kurze Zeit nach Versuchsbeginn die Potentiale sehr steil an, erreichen den Höhepunkt nach 10 Minuten, um dann allmählich über 1 Stunde verteilt zu einem Basispotential abzusinken. Der Potentialanstieg in den ersten 10 Minuten war bei den einzelnen Versuchstieren unterschiedlich groß, so daß die Werte stark um den errechneten Mittelwert streuten. Im Verlaufe der Versuche kam es zu einer Angleichung der Meßwerte und damit zu einer Verkleinerung der Streuung.
Tabelle 2a gibt den Transport in µ Mol zu den angegebenen Zeitpunkten wieder.
Der Galaktosetransport verhält sich ähnlich, die einzelnen Werte streuen am ersten Meßpunkt nach 20 Minuten Versuchsdauer stärker als am Ende des Versuches.
Die Hemmung des Galaktosetransportes konnte durch Zugabe von Phlorrizin erreicht werden. Innerhalb kürzester Zeit sank der Transport auf eine kleine verbleibende Transportgröße, die auf passive Diffusion bezogen werden kann.

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen den Anstieg des Potentials und des Galaktosetransportes nach Zugabe von 10 ml 10 mM Galaktose und die Hemmung durch 2,4- DNP.
Das nach Zugabe von Galaktose sich innerhalb von 10 Minuten gebildete Potential wurde durch Zugabe des Hemmstoffes sehr schnell gesenkt. Bereits nach 30 Minuten war das Basispotential annähernd wieder erreicht.
Der Galaktosetransport verhält sich anders, nach Zugabe von 2,4-DNP kam es zu einem Anstieg, um dann sehr schnell abzusinken und erneut anzusteigen. Erst dann pendelte sich das Grundniveau ein.

Die Abbildungen 5 und 6 zeigen den nach Zugabe von 10 ml

10 mM Galaktose innerhalb von 10 Minuten erreichten Potential- und Galaktosetransportwert und die Hemmung durch Zugabe von Monojodacetat.
Wie im Falle des 2,4- DNP sinkt das Potential ab, wenn auch nicht so schnell und der Galaktosetransport steigt zuerst an, um dann sehr schnell und gleichmäßig abzusinken.
Das deckt sich mit Versuchen von BRÜCKNER (41), das Phlorrizin und Monojodacetat eine größere Hemmwirkung auf den Galaktosetransport haben als 2,4- DNP.

Die abgebildeten Kurven entsprechen den in den Tabellen angeführten Meßwerten.

Versuch mit 10 ml 10 mM Galaktose über 1 Stunde gemessen.

Potentiale in mV gemessen zu den angegebenen Zeiten

Tabelle 1:

Datum	Zeit: 10 min.	20	30	40	50	60
13.10.70	8,4	7,2	6,3	3,6	3,0	2,0
20.10.70	4,8	4,0	3,4	2,8	2,3	2,1
24. 2.71	3,2	2,6	2,0	2,0	2,0	1,9
24. 2.71	3,6	2,5	2,1	1,6	1,0	1,0
5. 3.71	3,6	2,8	2,2	1,4	1,2	1,2
5. 3.71	4,0	3,6	3,2	3,2	2,2	2,1
5. 3.71	3,4	2,8	3,4	2,7	2,3	2,3
$\bar{x}$:	4,429	3,643	3,229	2,471	2,000	1,800
S:	1,827	1,663	1,491	0,826	0,690	0,497
Median:	3,600	2,800	3,200	2,700	2,200	2,000
Range :	5,200	4,700	4,300	2,200	2,000	1,300

Differenzen zwischen den einzelnen Zeitpunkten

Tabelle 1a:

Datum:	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	X	S	Median
13.10.70	1,2	0,9	2,7	0,6	1,0	1,280	0,823	1,000
20.10.70	0,8	0,6	0,6	0,5	0,2	0,540	0,219	0,600
24. 2.71	0,6	0,6	0,0	0,0	0,1	0,260	0,313	0,100
24. 2.71	0,9	0,4	0,5	0,6	0,0	0,480	0,327	0,500
5. 3.71	0,8	0,6	0,8	0,2	0,2	0,520	0,303	0,600
5. 3.71	0,4	0,4	0,0	1,0	0,1	0,380	0,390	0,400
5. 3.71	0,6	0,6	0,7	0,4	0,0	0,460	0,279	0,600

relative Häufigkeit in % zu den angegebenen Zeitpunkten

Tabelle 1b:

Datum:	10	20	30	40	50	60
13.10.70	100 %	87,1	75,--	42,85	35,71	23,80 %
20.10.70	100 %	83,33	70,83	58,33	47,91	43,75
24. 2.71	100 %	81,25	62,50	62,50	62,50	59,37
24. 2.71	100 %	68,44	58,33	44,44	27,77	27,77
5. 3.71	100 %	77,77	61,11	38,88	33,33	33,33
5. 3.71	100 %	90,00	80,00	80,00	55,00	52,50
5. 3.71	100 %	82,35	100,00	79,41	67,64	67,64
$\bar{x}$:		81,606	77,539	58,059	47,123	44,023
S:		6,671	14,446	17,038	15,357	16,597
Median:		82,35	70,83	58,330	47,910	43,750
Range :		20,56	41,47	41,12	39,87	43,84

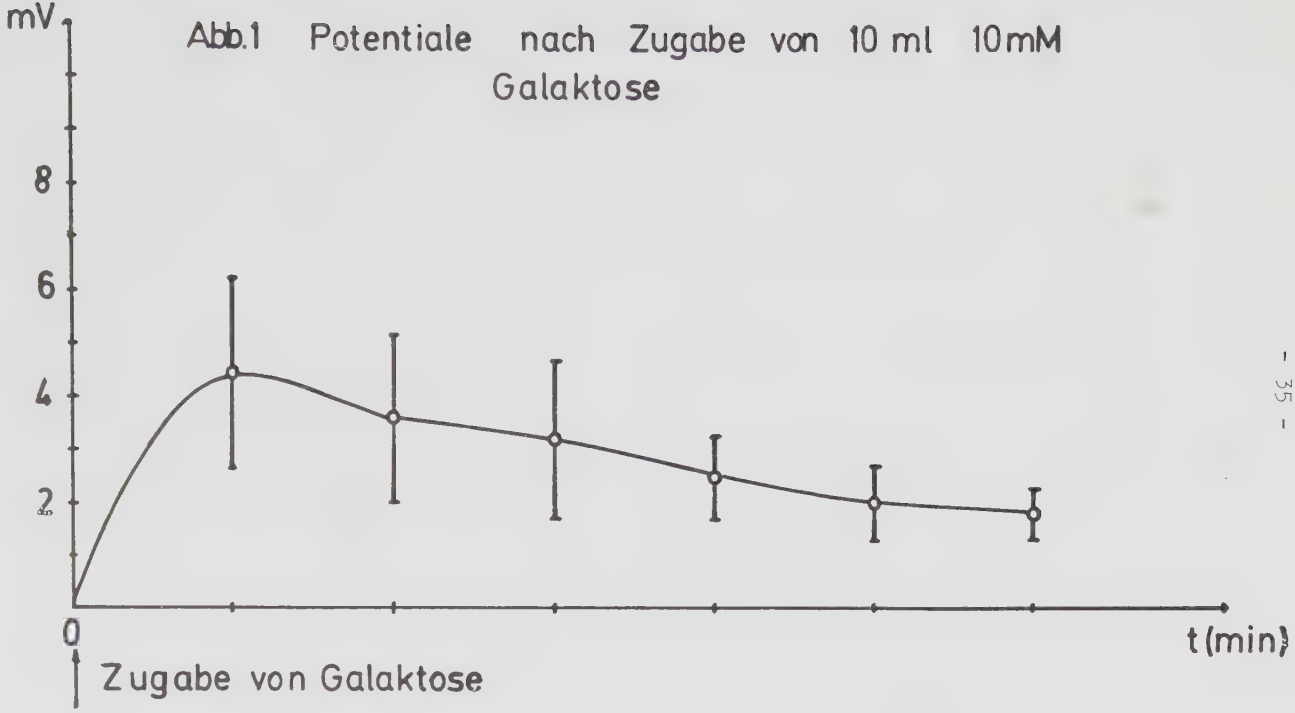


Abb.1 Potentiale nach Zugabe von 10 ml 10mM Galaktose

Galaktosetransport in µMol zu den angegebenen Zeitpunkten

Tabelle 2:

Versuchs-nummer	Datum	Zeit: min. 20	30	40	40-50	50-60
8.	13.10.70	0,62	1,46	1,87	3,34	4,56
9.	20.10.70	0,90	1,54	2,83	3,18	4,34
10.	24. 2.71	1,85	1,86	2,88	3,22	3,70
11.	24. 2.71	1,49	2,00	2,50	3,67	4,69
12.	5. 3.71	1,59	2,10	2,51	3,82	4,14
13.	5. 3.71	0,52	1,65	1,74	3,85	3,99
14.	5. 3.71	1,25	1,80	2,50	4,03	4,08
	$\bar{x}$:	1,174	1,773	2,404	3,587	4,214
	S:	0,508	0,236	0,440	0,339	0,342
	Median:	1,250	1,800	2,500	3,670	4,140
	Range :	1,330	0,640	1,140	1,150	0,990

Differenzen zwischen den einzelnen Zeitpunkten

Tabelle 2a:

Datum:	20-30	30-40	40-50	50-60	$\bar{x}$	S	Median
13.10.70	0,84	0,41	1,37	1,22	0,960	0,429	1,030
20.10.70	0,64	1,29	0,35	1,16	0,860	0,441	0,900
24. 2.71	0,01	1,02	0,34	0,48	0,463	0,421	0,410
24. 2.71	0,51	0,50	1,17	1,02	0,800	0,346	0,765
5. 3.71	0,51	0,41	1,31	0,32	0,638	0,455	0,460
5. 3.71	1,13	0,09	2,11	0,14	0,868	0,957	0,635
5. 3.71	0,55	0,70	1,53	0,05	0,708	0,615	0,625

relative Häufigkeit in % zu den angegebenen Zeitpunkten

Tabelle 2b:

Datum	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60
13.10.70	13,59	31,73	41,00	73,24	100 %
20.10.70	20,73	35,71	65,20	73,27	100 %
24. 2.71	50,00	50,00	77,83	87,02	100 %
24. 2.71	32,39	42,64	53,30	78,25	100 %
5. 3.71	38,40	50,72	60,62	92,27	100 %
5. 3.71	13,03	41,35	43,60	98,71	100 %
5. 3.71	30,63	44,11	61,27	98,77	100 %
$\bar{x}$:	28,396	42,323	57,546	85,020	
S:	13,551	6,948	12,778	11,179	
Median:	30,630	42,640	60,620	87,020	
Range :	36,97	12,38	36,83	25,53	

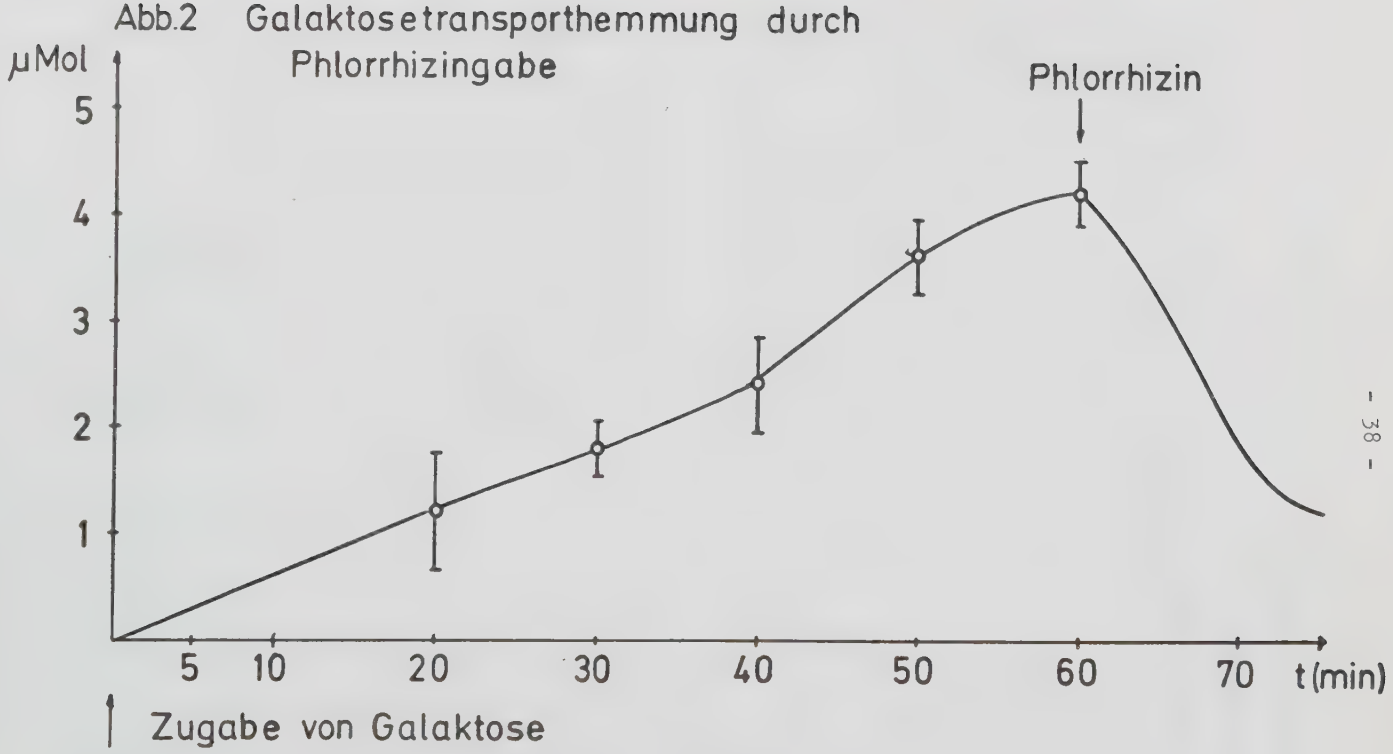


Abb.2 Galaktosetransporthemmung durch Phlorrhizingabe
µMol
5
4
3
2
1
Phlorrhizin
5
10
20
30
40
50
60
70
t(min)
Zugabe von Galaktose

Versuche mit 10 ml 10 mM Galaktose und 2,7 mg DNP als Hemmstoff über 1 Stunde gemessen.
Potentiale in mV zu den angegebenen Zeiten.

Tabelle 3:

Datum	Zeit: min. 10 Gal	10	20	30	40	50	60
4.12.71	4,4	2,0	0,8	0,6	0,6	0,4	0,2
4.12.71	5,0	2,7	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4
6.12.71	5,0	3,0	1,4	0,8	0,6	0,4	0,2
10.12.71	4,3	2,0	1,0	0,6	0,6	0,3	0,2
13. 1.72	6,2	3,3	1,8	1,2	1,0	0,6	0,3
18. 1.72	4,5	3,9	1,8	1,3	1,0	0,8	0,5
18. 1.72	4,8	3,3	1,9	1,2	0,7	0,4	0,3
21. 1.72	5,8	3,1	1,7	0,6	0,6	0,4	0,2
21. 1.72	4,8	2,6	1,0	0,5	0,5	0,3	0,3
$\bar{x}$:	4,978	2,878	1,400	0,867	0,711	0,467	0,288
S:	0,638	0,624	1,415	0,312	0,183	0,166	0,113
Median:	4,800	3,000	1,400	0,800	0,600	0,400	0,250
Range :	1,900	1,900	1,100	0,800	0,500	0,500	0,300

Differenzen zwischen den einzelnen Zeitpunkten

Tabelle 3a:

Datum	10	20	30	40	50	60	$\bar{x}$	S	Median
4.12.71	2,4	1,2	0,2	0,0	0,2	0,2	0,700	0,936	0,200
4.12.71	2,3	1,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,750	0,898	0,200
6.12.71	2,0	1,6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,800	0,800	0,400
10.12.71	2,3	1,0	0,4	0,0	0,3	0,1	0,683	0,866	0,350
13. 1.72	2,9	1,5	0,6	0,2	0,4	0,3	0,983	1,050	0,500
18. 1.72	0,6	2,1	0,5	0,3	0,2	0,3	0,667	0,717	0,400
18. 1.72	1,5	1,4	0,7	0,5	0,3	0,1	0,750	0,579	0,600
21. 1.72	2,7	1,4	1,1	0,0	0,2	0,2	0,933	1,031	0,650
21. 1.72	2,2	1,6	0,1	0,0	0,2	0,0	0,683	0,964	0,150

relative Häufigkeit in % zu den angegebenen Zeitpunkten.
Potential nach Zugabe von DNP.

Tabelle 3b:

Datum	nach 10 Min.	10 Gal.	20	30	40	50	60
4.12.71	100 %	45,45	18,18	13,63	13,63	9,09	4,54
4.12.71	100 %	54,00	24,00	20,00	15,68	12,00	8,00
6.12.71	100 %	60,00	28,00	16,00	12,00	8,00	4,00
10.12.71	100 %	46,51	23,25	13,95	13,95	6,97	4,83
13. 1.72	100 %	86,66	40,00	28,88	22,22	17,77	11,11
18. 1.72	100 %	68,75	39,58	25,00	14,58	8,33	6,25
21. 1.72	100 %	53,44	29,31	10,34	10,34	6,89	3,44
21. 1.72	100 %	54,16	20,83	10,41	10,41	6,25	6,25
$\bar{x}$:		58,6	27,894	17,276	14,101	9,413	6,053
S:		13,5	8,160	6,793	3,800	3,820	2,515
Median:		54,1	26,00	14,975	13,790	8,165	5,540
Range :		41,2	21,82	18,54	11,88	11,52	7,67

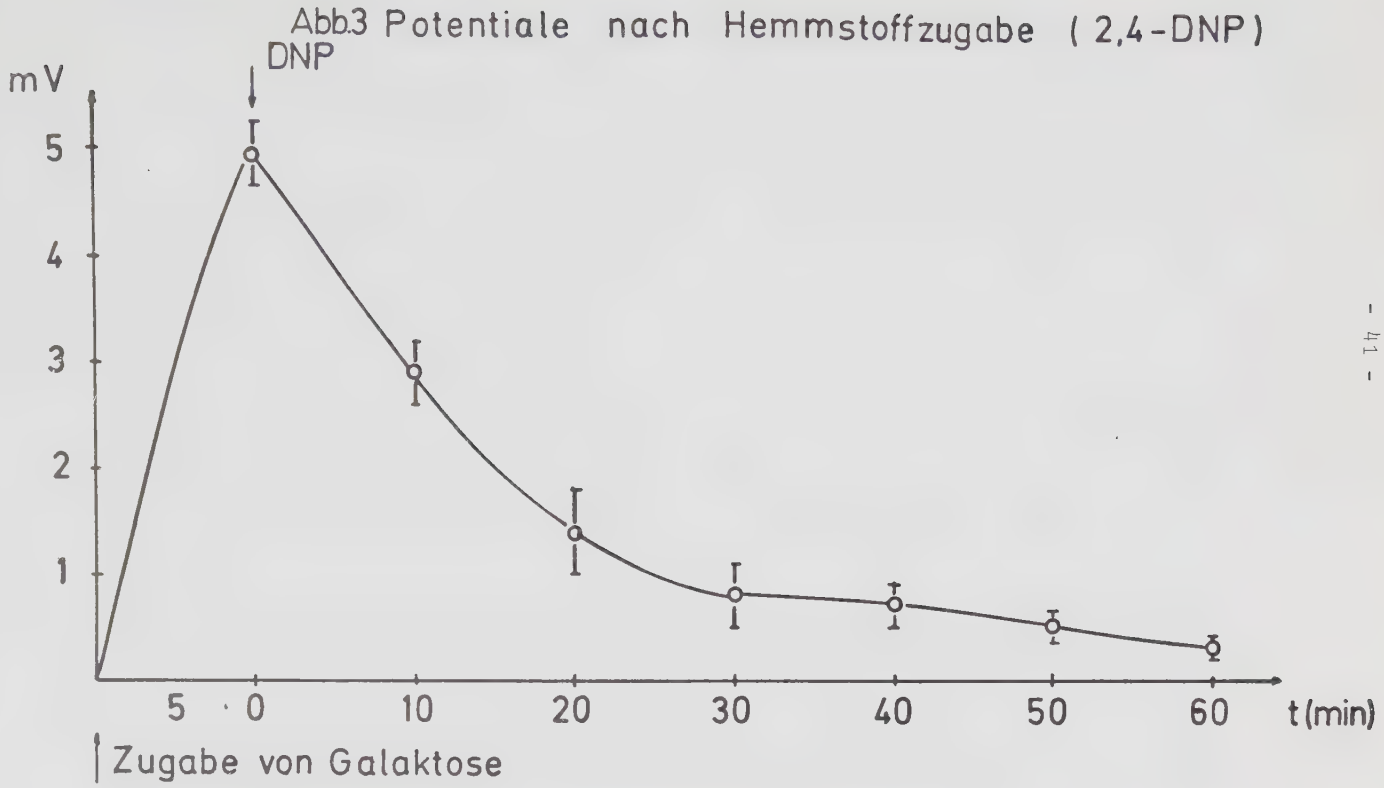


Abb.3 Potentiale nach Hemmstoffzugabe (2,4-DNP)
DNP
mV
5
4
3
2
1
5
0
10
20
30
40
50
60
t(min)
Zugabe von Galaktose

Transport in µMol zu den angegebenen Zeiten

Tabelle 4:

Datum	Zeit min. 10	20	30	40	50	60
4.12.71	4,21	0,54	1,25	1,61	1,13	0,88
4.12.71	3.68	0,99	1,61	1,60	1,02	0,73
6.12.71	5,70	1,37	1,74	1,14	1,17	0,60
10.12.71	5,38	1,39	1,35	1,10	0,94	0,81
13.12.71	3,76	0,54	1,26	1,27	0,69	0,72
13. 1.72	3,30	1,58	0,33	0,96	0,83	0,60
18. 1.72	2,48	0,69	1,32	0,94	0,92	0,79
18. 1.72	3,20	0,92	1,59	1,42	1,23	0,78
21. 1.72	3,40	0,48	0,85	1,01	0,84	0,66
$\bar{x}$:	3,901	0,944	1,256	1,228	0,974	0,730
S:	1,043	0,417	0,434	0,262	0,178	0,096
Median:	3,680	0,920	1,320	1.140	0,940	0,730
Range :	3,220	1,100	1,410	0,670	0,540	0,220

Differenz zwischen den einzelnen Zeitpunkten

Tabelle 4a:

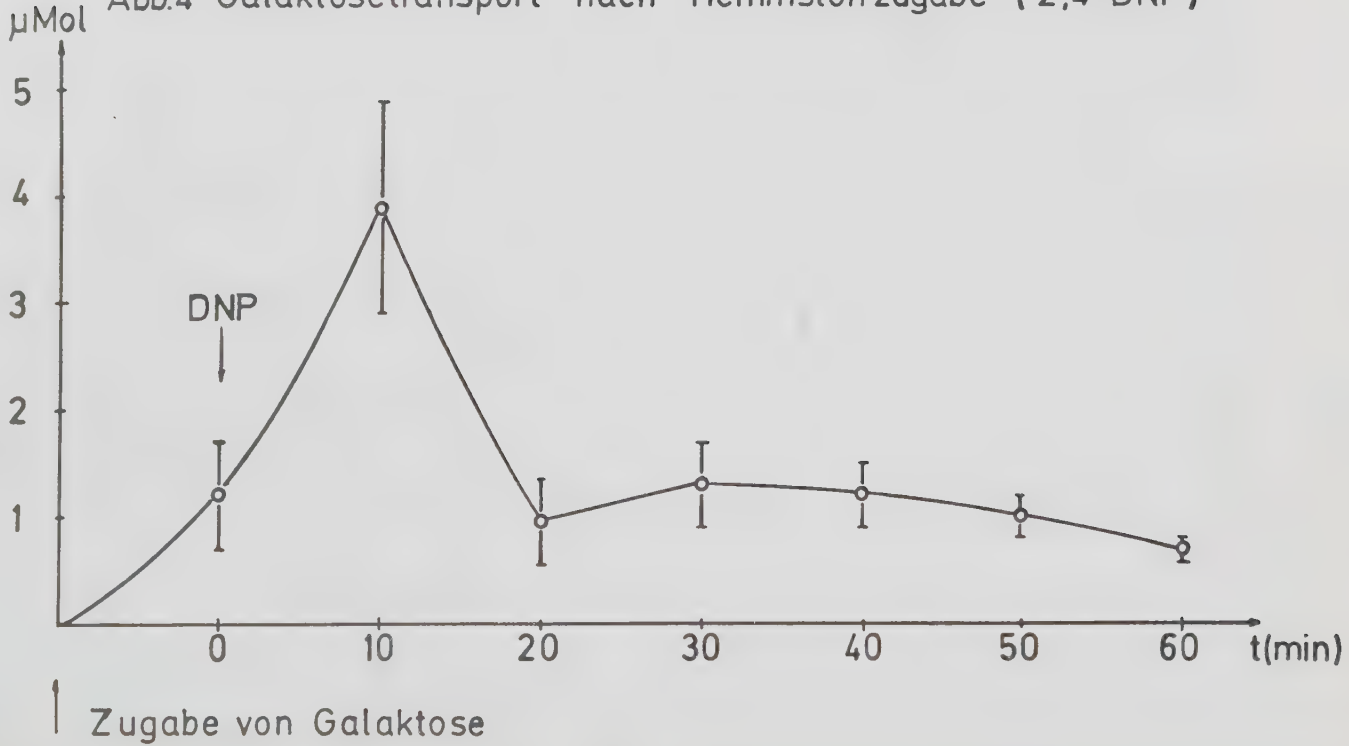
Datum	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	$\bar{x}$	S	Median
4.12.71	3,7	0,71	0,36	0,48	0,25	1.100	1,463	0,480
4.12.71	2,69	0,62	0,01	0,58	0,71	0,922	1,026	0,620
6.12.71	4,33	0,37	0,60	0,03	0,43	1,152	1,789	0,430
10.12.71	4,01	0,04	0,24	0,16	0,16	0,916	1,731	0,160
13.12.71	3,22	0,72	0,01	0,58	0,03	0,912	1,329	0,580
13. 1.72	1,72	1,25	0,63	0,13	0,23	0,792	0,680	0,630
18. 1.72	1,59	0,63	0,38	0,02	0,13	0,550	0,627	0,380
18. 1.72	2,28	0,67	0,17	0,19	0,45	0,752	0,879	0,450
21. 1.72	2,92	0,37	0,16	0,83	0,18	0,892	1,165	0,370

relative Häufigkeit in % zu den angegebenen Zeitpunkten

Tabelle 4b:

Datum	10	20	30	40	50	60
4.12.71	100 %	12,82	29,69	38,24	26,84	20,90
4.12.71	100 %	26,90	43,75	43,47	27,71	19,23
6.12.71	100 %	24,03	3056	20,00	20,56	10,52
10.12.71	100 %	25,83	25,09	20,44	17,47	15,05
13.12.71	100 %	14,36	33,51	38,77	18,35	19,14
13. 1.72	100 %	47,87	10,00	29,09	25,15	18,18
18. 1.72	100 %	27,82	53,22	37,90	37,09	31,85
18. 1.72	100 %	28,75	49,68	44,37	38,43	24,37
18. 1.72	100 %	14,11	25,00	29,70	24,70	19,41
$\bar{x}$:		24,721	33,389	33,553	26,256	19,857
S:		10,780	13,574	9,178	7,448	5,910
Median:		25,830	30,560	37,900	25,150	19,290
Range :		35,05	43,220	24,370	20,96	21,33

Abb.4 Galaktosetransport nach Hemmstoffzugabe (2,4-DNP)



Versuche mit 10 ml 10 mM Galaktose und 2,31 mg Monojodacetat als Hemmstoff über 1 Stunde gemessen.
Potentiale in mV zu den angegebenen Zeiten

Tabelle 5:

Versuchs-nummer	Datum	Zeit min. 10 Gal	10	20	30	40	50	60
33	2.12.71	4,9	4,6	2,8	1,5	1,0	0,3	0,2
34	4.12.71	4,6	4,4	3,0	1,7	1,2	0,5	0,2
35	4.12.71	4,8	2,8	2,0	1,5	0,8	0,4	0,3
36	6.12.71	3,9	3,1	2,0	1,4	0,9	0,4	0,2
37	10.12.71	5,1	4,6	3,0	1,6	1,0	0,5	0,3
38	10.12.71	4,3	3,2	2,8	1,2	0,8	0,4	0,4
39	13. 1.72	6,0	5,8	4,5	4,0	3,4	2,5	1,0
40	18. 1.72	4,1	3,8	2,5	1,4	1,0	0,4	0,2
41	21. 1.72	4,9	4,4	2,0	1,0	0,5	0,3	0,2
	$\bar{x}$:	4,733	4,078	2,733	1,700	1,178	0,633	0,333
	S:	0,622	0,946	0,786	0,887	0,856	0,704	0,260
	Median:	4,800	4,400	2,800	1,500	1,000	0,400	0,200
	Range :	2,100	3,000	2,500	3,000	2,900	2,200	0,800

Differenz zwischen den einzelnen Zeitpunkten, Potentiale nach Zugabe von Monojodacetat

Tabelle 5a:

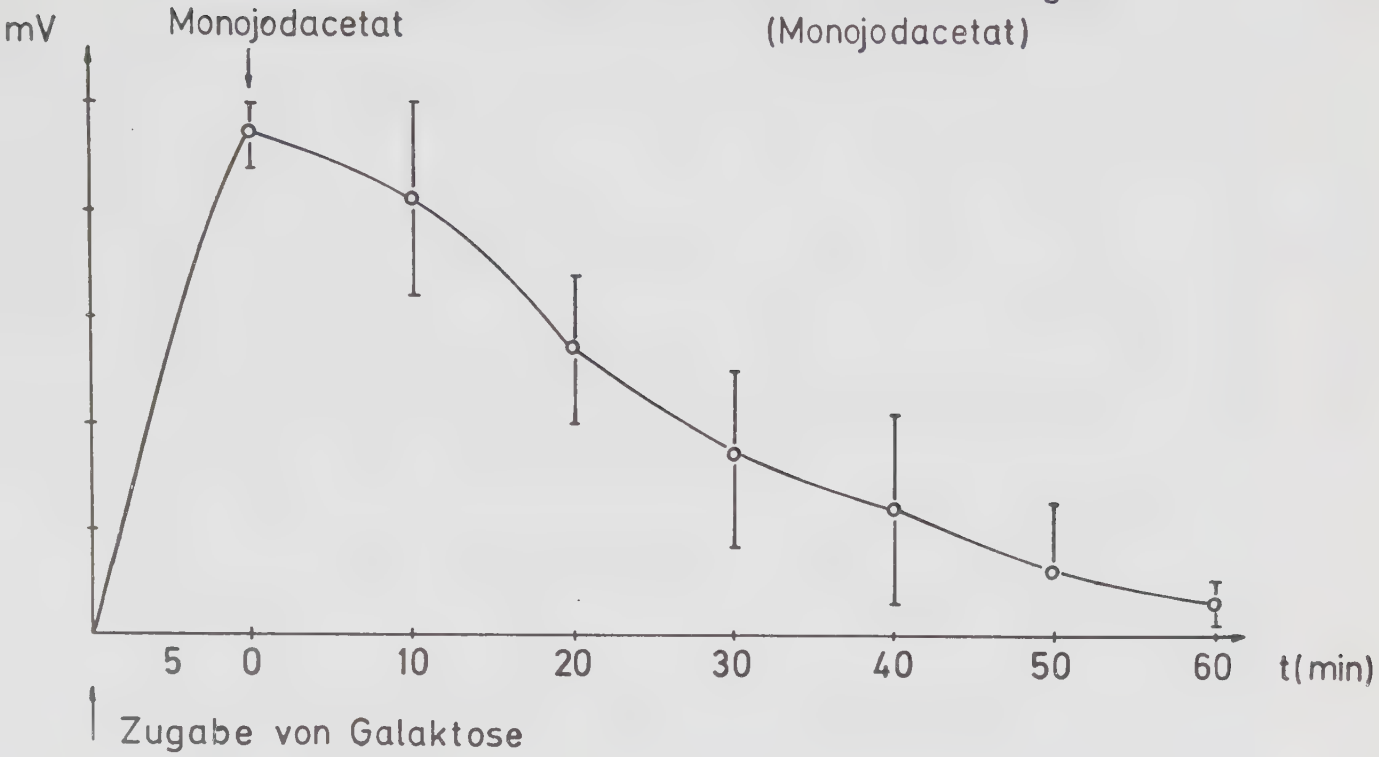
Datum	10 Min. Gal.	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	$\bar{x}$	S	Median
4.12.71	0,3	1,8	1,3	0,5	0,7	0,3	0,817	0,608	0,600
4.12.71	0,2	1,4	1,3	0,5	0,7	0,3	0,733	0,509	0,600
4.12.71	2,0	0,8	0,5	0,7	0,4	0,1	0,750	0,660	0,600
6.12.71	0,8	1,1	0,6	0,5	0,5	0,2	0,617	0,306	0,550
10.12.71	0,5	1,6	1,4	0,6	0,5	0,2	0,800	0,562	0,550
10.12.71	1,1	0,4	1,6	0,4	0,4	0,0	0,650	0,586	0,400
13. 1.72	0,2	1,3	0,5	0,6	0,8	1,5	0,833	0,497	0,750
18. 1.72	0,3	1,3	1,1	0,4	0,6	0,2	0,650	0,451	0,500
21. 1.72	0,5	2,4	1,0	0,5	0,2	0,1	0,783	0,852	0,500

relative Häufigkeit in % zu den angegebenen Zeitpunkten, Transport nach Zugabe von Monojodacetat

Tabelle 5b:

Datum	10 Min. Gal.	10	20	30	40	50	60
2.12.71	100 %	93,87	57,14	30,61	20,40	6,12	4,08
4.12.71	100 %	95,65	65,21	36,95	46,00	10,86	4,34
4.12.71	100 %	58,33	41,66	18,75	16,66	8,33	6,25
4.12.71	100 %	79,48	51,28	35,89	23,07	10,25	5,12
10.12.71	100 %	90,12	58,82	31,37	19,60	9,80	5,88
10.12.71	100 %	74,41	65,11	27,90	18,60	9,30	9,30
13. 1.72	100 %	96,66	75,00	66,66	56,66	41,66	16,66
18. 1.72	100 %	92,68	68,91	34,14	24,39	9,75	4,8
21. 1.72	100 %	89,79	40,81	20,40	10,20	6,12	4,08
$\bar{x}$:		85,667	58,216	33,630	26,176	12,466	6,723
S:		12,679	11,828	13,923	15,062	11,079	4,066
Median:		90,120	58,820	31,370	20,400	9,750	5,120
Range :		38,33	34,19	47,91	46,46	35,54	12,58

Abb. 5 Potentiale nach Hemmstoffzugabe (Monojodacetat)



Transport in µMol zu den angegebenen Zeiten

Tabelle 6:

Datum	Zeit Min. 10	20	30	40	50	60
2.12.71	4,32	3,13	1,59	1,76	0,85	0,56
4.12.71	4,55	2,50	1,55	1,88	0,71	0,67
4.12.71	3,75	2,94	1,49	1,47	0,79	0,60
6.12.71	4,46	2,79	2,53	1,58	1,30	1,30
10.12.71	4,85	2,15	1,36	1,00	0,92	0,36
10.12.71	3,68	2,47	1,19	1,41	1,19	0,51
13.12.71	3,48	1,66	1,55	1,00	0,54	0,63
13. 1.72	2,98	1,95	1,36	072	0,74	0,61
18. 1.72	3,60	3,56	0,75	1,12	0,90	0,85
21. 1.72	0,70	2,61	1,35	0,65	1,24	0,64
$\bar{x}$:	3,937	2,576	1,469	1,259	0,918	0,673
S:	0,580	0,566	0,445	0,425	0,250	0,253
Median:	3,725	2,555	1,425	1,265	0,875	0,620
Range :	1,880	1,900	1,880	1,230	0,760	0,940

Differenz zwischen den einzelnen Zeitpunkten

Tabelle 6a:

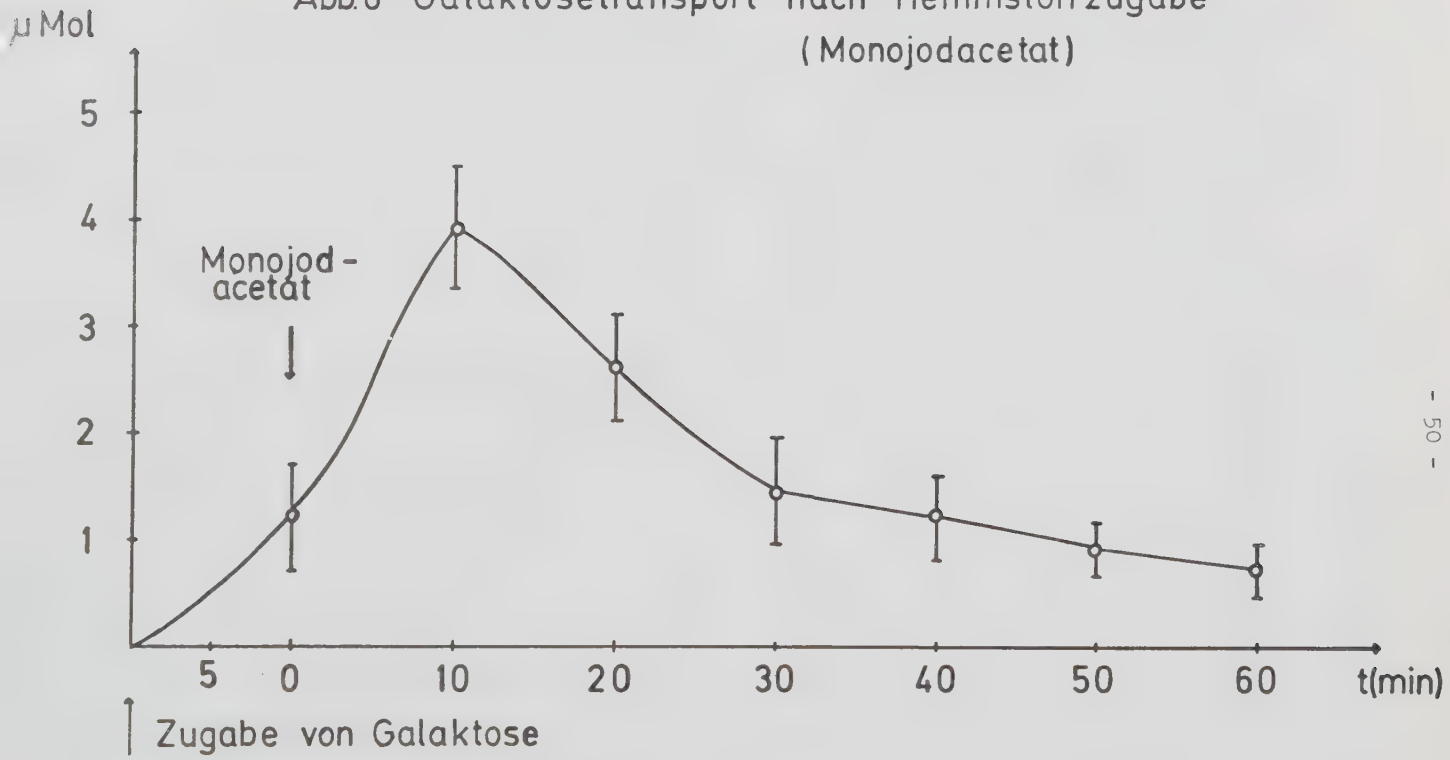
Datum	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	$\bar{x}$	S	Median
2.12.71	1,19	1,54	0,17	0,81	0,29	0,800	0,582	0,810
4.12.71	2,05	0,95	0,23	0,17	0,04	0,688	0,840	0,230
4.12.71	0,81	1,45	0,02	0,68	0,19	0,630	0,564	0,680
6.12.71	1,67	0,26	0,95	0,28	0,08	0,648	0,660	0,280
10.12.71	2,70	0,79	0,36	0,08	0,56	0,898	1,041	0,560
10.12.71	1,21	1,28	0,22	0,22	0,68	0,722	0,514	0,680
13.12.71	1,82	0,11	0,55	0,46	0,09	0,606	0,709	0,460
13. 1.72	1,03	0,59	0,54	0,02	0,13	0,462	0,403	0,540
18. 1.72	0,04	2,81	0,27	0,22	0,05	0,678	1,186	0,220
21. 1.72	1,09	1,26	0,70	0,59	0,60	0,848	0,300	0,700

relative Häufigkeit zu den angegebenen Zeitpunkten

Tabelle 6b:

Datum	10 Min.	20	30	40	50	60
2.12.71	100 %	72,45	36,80	40,74	19,67	20,96
4.12.71	100 %	54,94	34,06	41,31	15,60	14,77
4.12.71	100 %	78,40	39,73	39,20	21,06	16,00
6.12.71	100 %	62,55	56,72	35,42	29,14	29,14
10.12.71	100 %	44,32	28,04	20,61	18,96	7,42
10.12.71	100 %	67,11	32,33	38,31	32,33	13,85
13.12.71	100 %	47,70	44,54	28,73	15,51	18,10
13.1.72	100 %	98,88	20,83	31,11	25,00	23,61
21. 1.72	100 %	70,54	36,48	17,56	33,51	17,29
$\bar{x}$:		65,988	36,614	32,554	23,42	17,016
S:		17,162	10,151	8,756	6,889	6,288
Median:		67,11	36,480	35,42	21,06	16,00
Range :		54,56	35,89	23,75	18,00	21,72

Abb.6 Galaktosetransport nach Hemmstoffzugabe
(Monojodacetat)



4. Statistische Prüfung:

Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen. Da die Verteilungsform nicht bekannt war, fiel die Entscheidung für diesen Test. Die Effizienz dieses Testes liegt für große und kleine Stichprobenumfänge bei 95 %.
Zu dieser statistischen Prüfung sollten die Potentialwerte nach 10 Minuten und 60 Minuten des Versuches verglichen und festgestellt werden, ob ein Unterschied zwischen beiden besteht.
Geprüft wurden die Hypothesen:

H_o: Das beim Galaktosetransport entstandene Potential verändert sich nicht

und H_1: Das beim Galaktosetransport entstandene Potential verändert sich.

Das Signifikanzniveau wurde in beiden Richtungen, also zweiseitig geprüft, bei α = 5%.
Davon wurde die Summe der positiven und negativen Rangzahlen gebildet und so kontrolliert,

$$\hat{R}_p + \hat{R}_n = n \quad (n + 1) \; /2$$

Daraus folgt, daß die Nullhypothese verworfen wird, wenn der berechnete R Wert kleiner oder gleich dem kritischen Wert R (n;2) der Tabelle der kritischen Werte für den Wilcoxon-Paardifferenzentest ist.

$$R\,(n;2) = \frac{n\,(n+1)}{4} \; z \cdot \sqrt{\frac{1}{24}\, n\,(n+1)(2n+1)}$$

Ergebnis: $0 < 2 = R(7;\ 0{,}05)$.
Da $0 < 2 = R\,(7;\ 0{,}05)$ wird die Nullhypothese (H_0) auf der 5%-Stufe abgelehnt. Das bedeutet, daß zwischen den Werten nach 10 und 60 Minuten auch nach statistischer Prüfung ein Unterschied besteht.
Im Fall 2, dem Transport für Galaktose, wurden wieder die Hypothesen H_0 und H_1 gegenüber gestellt. Geprüft wurde zweiseitig bei einem Signifikanzniveau von 5 %.
Ergebnis: $0 < 2 = R\,(7;\ 0{,}05)$.

Hier wird H_0 auf der 5%-Stufe auch abgelehnt, das bedeutet, daß zwischen den Werten der Messung des Galaktosetransportes nach 10 und 60 Minuten statistisch gesehen ein Unterschied besteht.

Diese Ergebnisse verglichen mit den Messungen der Potentiale nach Zugabe von 2,4-DNP und Monojodacetat ergeben:

Nach Vergleich der Potentialwerte 10 und 60 Minuten nach Zugabe von 2,4-DNP und Monojodacetat lautet das Ergebnis:

$$0 < 5 = R\ (9;\ 0{,}05).$$

Das bedeutet: Die Nullhypothese auf der 5%-Stufe kann für die gewählten Beispiele abgelehnt werden, es besteht ein Unterschied zwischen den Werten von 10 und 60 Minuten.

Zusätzlich wurden zur statistischen Sicherung der Meßergebnisse der Medianwert, Range, das arrithmetische Mittel und die Streuung errechnet.

Bei der Bestimmung der Differenzen zwischen den einzelnen Zeitpunkten wurden in einer Versuchsgruppe ähnliche arrithmetische Mittel errechnet, was für die Gleichartigkeit und Aussagekraft der Versuche spricht.

Die relative Häufigkeit in % zu den angegebenen Zeitpunkten wurde errechnet. Dabei wurde der Maximalwert der Kurve = 100 % gesetzt.

V. Ergebnisse:

Der Monosaccharidtransport am Dünndarm von Ratten kann gemessen werden, der Dünndarm kann dazu lebensfähig gehalten werden und es ist möglich, Potentiale abzuleiten. Zu ähnlichen Ergebnissen sind MÜLLER und Mitarbeiter (39) gelangt.
Nach Zugabe von 10 ml 10 mM Galaktose läßt sich ein Galaktosetransport und ein Potential ableiten und messen. Während der Galaktosetransport langsam ansteigt, nimmt das aufgebaute Potential allmählich ab. 2,4-DNP, Monojodacetat und Phlorrizin senken den Galaktosetransport sofort. Die Hemmwirkung des Monojodacetat kann durch die Störung der Energiebereitstellung erklärt werden. Die Hemmwirkung des Phlorrizins kommt nach CRANE durch kompetetive Verdrängung des Zuckers vom Carrier zustande. Phlorrizin dringt nicht in die Zelle ein, sondern wird an der Zellmembran fixiert. An der Basalmembran der Epithelzelle gibt es einen phlorrizinempfindlichen Carrier. Der aktive Transport der Galaktose ist Na^+ abhängig, und um aktiv resorbierbare Zucker sind Konkurrenzhemmungen um den gleichen Carrier bekannt.
Die Potentiale sinken nach Zugabe von 2,4-DNP schneller als nach Zugabe von Monojodacetet. Unmittelbar nach Zugabe des Hemmstoffes war in beiden Fällen zuerst ein Ansteigen des Transportes zu verzeichnen. Der Galaktosetransport sinkt nach Zugabe von Monojodacetat sehr schnell, dagegen steigt er nach Zugabe von 2,4-DNP kurzzeitig an, um dann wieder abzusinken. Daraus folgt, daß Phlorrizin eine größere Hemmwirkung auf den Galaktosetransport hat als 2,4-DNP. Das deckt sich auch mit den Versuchen von BRÜCKNER (41).
Da sowohl Jodacetat als auch Phlorrizin an Teilschritten des aktiven- b zw. Trägertransportes angreifen, muß die verbliebene Resorptionsgröße vorwegend auf passive Diffusion bezogen werden.

VI. Diskussion:

Die Theorie des Zuckertransportes ist heute an einer sehr kritischen Stelle angelangt. Es ist schwierig zu entscheiden, welche Theorie der verschiedenen Autoren gültig ist.

Der Darm als zentrales Organ der Stoffaufnahme und als Ort intensiver Wasser- und Elektrolytverschiebungen ist als Untersuchungsobjekt für die Erforschung zellulärer und transzellulärer Transportprozesse gut geeignet. Die vom Resorptionsepithel ausgekleidete, durch die Zotten bereits stark vergrößerte Schleimhautoberfläche mißt etwa 10 m^2. Durch die Mikrovilli der Mukosazellen nimmt sie auf etwa 200 m^2 zu. Die Zellmembran, die bei der Resorption zu überwinden ist, stellt ein kompliziertes Gebilde aus Protein- und Lipidschichten dar, deren genaue Struktur noch nicht bekannt ist. Die Resorption der meisten Substanzen erfolgt gegen ein Konzentrationsgefälle und wird als aktiver Transport bezeichnet. Der Mechanismus des aktiven Transportes wird nach experimentellen Befunden als Carrierhypothese dargestellt. C + S = CS, der Komplex überwindet die Permeabilitätsschranke.

Die Höhe der Transportgeschwindigkeit durch eine katalysierte Reaktion gegenüber der freien Diffusion hängt vom Ausmaß der Bildung des CS-Komplexes ab, vom Verhältnis des Reibungskoeffizienten der freien Komponente und des CS-Komplexes und vom Konzentrationsgradienten des CS-Komplexes über der Zellmembran. Der Nettotransport kann als Differenz zweier unidirektionaler Fluxe interpretiert werden, dem Influx und dem Efflux. Mit markierten Substanzen konnte nachgewiesen werden, daß die Geschwindigkeit der unidirektionalen Fluxe wesentlich größer ist als die des Nettotransportes. Der Konzentrationsausgleich ist ein dynamischer Zustand Influx = Efflux.

Es ist aber auch ein extrazellulärer Transport durch den Interzellulärraum möglich.
Hypothesen über den Mechanismus des Monosaccharidtransportes wurden von mehreren Autoren aufgestellt. Richtungweisen waren die Hypothesen von CRANE und KIMMICH.

CRANE hat die Vorstellung von einem ternären Komplex. Er postuliert, daß Zucker und Na^+ an einem gemeinsamen Carrier durch die Zellmembran transportiert werden. Die Affinität des Monosaccharids zum Carrier wird durch Na^+ erhöht. Die Asymmetrie der Na^+-Verteilung führt zur bergan-Akkumulation des Zuckers, weil die Reaktionsgeschwindigkeit C+S=CS von der Na^+-Konzentration des Mediums abhängt. Er interpretierte diese Ergebnisse als allosterische Aktivierung der Reaktion Na^+-Carrier durch das Monosaccharid und der Bindungsreaktion Monosaccharid-Carrier durch Na^+. Seine Ergebnisse beruhen auf Bestimmungen des durch Glukose ausgelösten Na^+-Transportes unter Variation der luminalen Glukose- bzw. Na^+-Konzentration. CRANE bewertet das transmurale Potential jedoch nicht nur als Meßgröße für den monosaccharidabhängigen Na^+-Transport, sondern auch für den Zuckertransport selbst, der nicht gemessen wurde. Nach der Hypothese bewies CRANE, daß K^+ und verwandte Ionen den Zuckertransport hemmen. In der Gegenwart von verschiedenen K^+- und Triskonzentrationen zeigt sich, daß Na^+ durch K^+ vom Transportsystem verdrängt wird. Er deutet es so, daß K^+ mit Na^+ um die spezifische Kationenbindungsseite am Zuckerträger konkurriert. Dadurch wird die Aktivität des Zuckers intrazellulär zusätzlich herabgesetzt. Der Angriffspunkt von Quabain wurde am aktiven Na^+-Efflux vermutet. Zwei grundlegende Annahmen sind in dem CRANE Modell vereinigt.

1. Jede Asymmetrie in der Zuckerverteilung, die an der Zellmembran erzeugt werden kann, ist das Ergebnis einer entgegengesetzten Asymmetrie der Na^+-Verteilung. Die Energie zur Erzeugung des Zuckergradienten wird aus der Energie des aufgestellten Na^+-Gradienten erhalten.

2. Die Zufuhr von Stoffwechselenergie, die das System benötigt, erscheint nur auf der Seite der Na^+-Ausschleusung. Eine direkte Energiezufuhr auf den Zuckerträger selbst erfolgt nicht. Zusätzlich zu diesen beiden Effekten nimmt CRANE an, daß eine aktive Zuckeraufnahme auch bei fehlender Stoffwechselenergiezufuhr möglich sein müßte, wenn

der normale Na^+-Gradient aufrecht erhalten wird. Wenn das Modell von CRANE funktionell richtig ist, müßte eine Umkehr des normalen Na^+-Gradienten eine aktive Zuckerausschleusung bewirken.

Kritik an dieser Hypothese:

1. Die kinetischen Konstanten sind allein durch die Messungen des monosaccharidinduzierten Potentials ermittelt worden, und es sind keine unidirektionale Na^+- und Monosaccharidfluxe gemessen worden.

2. Der Monosaccharidtransport wäre kein echter aktiver Transport, denn das Monosaccharid soll zusammen mit Na^+ an einem Carrier als ternärer Komplex durch die Mikrovillimembran transportiert werden. Dann würden, wenn zwischen intra- und extrazellulärem Raum kein Na^+-Gradient bestünde (z.B. nach Hemmung der ATPase durch Quabain oder Blockierung der ATP-Synthese) auch die Monosaccharide intrazellulär nicht mehr akkumuliert werden.

   Diese Auffassungen stehen jedoch im Gegensatz zu neueren Befunden von KIMMICH. Im Modell von KIMMICH wird besonders eine Klärung des Mechanismus für die Kopplung zwischen Stoffwechselenergie und Monosaccharidakkumulation versucht. Er zeigte, daß selbst bei Umkehr des normalen Gradienten der Zuckertransport in die Zelle mit gleicher Geschwindigkeit und gleichem Maß weitergeht. Mit der Na^+-Gradienthypothese unvereinbar ist das schlagartige Einsetzen der Hemmung der Zucker- und Aminosäureakkumulation durch Quabain. KIMMICH postuliert deshalb die Einbeziehung der Na^+- und K^+-ATPase in das Zuckertransportsystem, so daß danach sowohl ein aktiver Monosaccharid- als auch aktiver Ionentransport gegen den Gradienten an der Mikrovillimembran bestünde. Unter Berücksichtigung der Einzelergebnisse lassen sich interessante Beziehungen zum Monosaccharidtransport herstellen. Nicht der Na^+-Gradient

ist danach die Voraussetzung für den bergauf-Monosaccharidtransport, sondern die Stoffwechselenergie direkt.
KIMMICH zeigte 1970, daß Phlorrizin die Aminosäurespeicherung steigert, was eine weitere Stütze dafür ist, daß ein gemeinsames Intermediat sowohl für den Zucker- als auch für den Aminosäuretransport zur Verfügung steht.

In eigenen Versuchen werden der Zuckertransport gemessen und die entstandenen Potentiale abgeleitet. Es gelang, den Dünndarm dazu lebensfähig zu halten und aussagekräftiger Versuchsergebnisse zu erzielen. Der Galaktosetransport stieg nach Zugabe von 10 ml 10 mM Galaktose allmählich über 1 Stunde gemessen an, während das Potential abnahm. Phlorrizin, 2,4- DNP und Monojodacetat wurden als Hemmstoffe verwandt. Die Hemmwirkung ließ sich sehr deutlich nachweisen. Der Galaktosetransport wurde nach Zugabe von Phlorrizin um 55 % und nach Zugabe von Monojodacetat um 45 % gehemmt. Nach Zugabe von 2,4-DNP stieg der Galaktosetransport anfangs an, um dann abzufallen, so daß die Hemmwirkung des 2,4-DNP nicht ganz sicher erscheint.
Die Ergebnisse der Versuche wurden statistisch nach dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen ausgewertet. Der Vergleich der Potentialwerte und der Werte für den Galaktosetransport erfolgte bei 10 und 60 Minuten.
Es wurden die H_0 Hypothese: das entstandene Potential verändert sich nicht und die H_1 Hypothese: das entstandene Potential verändert sich, geprüft. Das Signifikanzniveau wurde in beiden Richtungen, also zweiseitig bei 5 % geprüft.
Der Test ergab, daß bei allen Vergleichen die Nullhypothese auf der 5%-Stufe abgelehnt werden kann und ein Unterschied zwischen den Werten nach 10 und 60 Minuten besteht.
Die erhaltenen Ergebnisse sind mit den genannten Vorstellungen über den aktiven Transport von CRANE gut in Übereinstimmung zu bringen. Aktiv resorbierte Monosaccharide werden unter Aufwendung zelleigener Stoffwechselenergie transportiert. Der Eintritt in die Zelle ist von einem Trägersystem abhängig.

Für den Austritt aus der Mucosazelle ist ein zweiter Carrier notwendig.

Zucker wird mittels eines Carriers in die Mucosazelle eingeschleust und unter Aufwendung von Stoffwechselenergie weiter transportiert. Die Spezifität des aktiven Transportes durch den Trägerprozeß und den "Pumpmechanismus" soll im luminalen Teil der Zellen im Bürstensaum liegen.

VII. Zusammenfassung:

Der Monosaccharidtransport am Dünndarm ist ein transcellulärer Transport. Für den Monosaccharidtransport ist die Struktur der Zelle besonders wichtig. Die Lipid- und Proteinanteile der Membran sollen kooperative Wechselbeziehungen eingehen und beim Transportvorgang von Bedeutung sein. Die Anordnung der Disaccharidasen in der Mikrovillimembran ist für die Aufnahme der Dissaccharide wichtig. CRANE hat das Modell eines mobilen Carriers in eine Hypothese eingebaut, in der der Zuckertransport eine Funktion der Na^+-Konzentration des Mediums ist. Er geht davon aus, daß Na^+ und die Monosaccharide an einem gemeinsamen Carrier gebunden werden und der Monosaccharidtransport durch Diffusion des beladenen Carriers entlang dem Na^+-Konzentrationsgradienten in die Mucosazelle erfolgt. Im Gegensatz zu CRANE ist KIMMICH der Meinung, daß nicht der Natrium-Gradient die Voraussetzung für den "bergauf" -Monosaccharidtransport, sondern die Stoffwechselenergie ist. KIMMICH setzt die Einbeziehung der Na^+- und K^+- ATPase in das Zuckertransportsystem voraus, so daß danach sowohl ein aktiver Monosaccharidtransport als auch ein aktiver Ionentransport gegen den Gradienten an der Mikrovillimembran bestünde.

In eigenen Versuchen wurde der Monosaccharidtransport gemessen und die gemessenen Potentiale abgeleitet. Der Monosaccharidtransport steigt allmählich an, die Potentiale nehmen ab. Der Monosaccharidtransport kann durch Hemmstoffe (Phlorrizin, 2,4-DNP und Monojodacetat) gehemmt werden.
Die Ergebnisse lassen sich mit Resultaten aus der Literatur vergleichen. Die statistische Prüfung nach dem Wilcoxon-Paartest zweiseitig geprüft ergab, daß die Nullhypothese auf der 5 %-Stufe abgelehnt werden kann und ein Unterschied zwischen den Werten der Potentiale und des Transportes bei 10 und 60 Minuten besteht. Die Vorstellungen von CRANE über den aktiven Transport bzw. den Trägertransport sind mit den erhaltenen Ergebnissen aus den eigenen Versuchen in Übereinstimmung zu bringen.

VIII. Literaturverzeichnis

1. ALVARADO, F.: Science, 151, 1010 (1966)
2. BIHLER, I. and R.K. CRANE: Biochem. Biophys. Acta 59, 78 (1962)
3. BOSACKOVA, I. and R.K. CRANE: Biochem. Biophys. Acta 102, 423 (1965)
4. BROWN, M.M. and PARSONS, D.S.: Biochem. Biophys. Acta 59, 249 (1962)
5. CHANGEUY, J.P.: Nobel. Symp. 11, 235 (1969)
6. CHANCE, B.: J. Biol. Chem. 236, 1544 (1961)
7. CHANCE, B.: J. Biol. Chem. 236, 1569 (1961)
8. CHANCE, B. and G.R. WILLIAMS: Advanc. Enzymol. 17, 65 (1956)
9. CORI, C.F.J.: Biol. Chem. 66, 691 (1925)
10. CRANE, R.K.: Fed. Proc. 21, 891 (1962)
11. CRANE, R.K.: Handbook of Physiol. Sect. 6, 1323 Vol. III, Amer. Phys. Sec. Washington 1968
12. CRANE, R.K.: Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 24, 1000 (1965)
13. CRANE, R.K., FORSTNER, G.and A. EICHHOLZ: Biochem. Biophys. Acta 109, 467 (1965)
14. CSAKY, P.Z.: Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 22, 3 (1963)
15. CURRAN, P.F.: Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 24, 993 (1965)
16. FAHN, S. and R.G. FAUST: J.Biol. Chem. 241, 1882 (1966).

16a. FAUST, R.G., WU, S.M.L. and M.L. FAGGARD: Science 155, 1261 (1967)

17. FOX, M., THIER, S., ROSENBERG, L. and S. SEGAL: Biochem. Biophys. Acta 79, 167 (1964)
18. HERZER, R., MERKER, H.J. und F.J. HABERICH: Z. ges. exp. Med. 150, 239 (1969)
19. INUI, Y. and CHRISTENSEN, H.N.: J. Gen. Physiol. 50, 203 (1966)
20. KIMMICH, G.A.: Biochemistry 9, 3659 (1970)

22. LE FEVRE, P.G.: Amer. J.Physiol. 203, 286 (1962)
23. MERKER, H.J.: Verh. dtsch. Ges. Path., Fischer Stuttgart 1969
24. MITCHELL, P.: in: Adv. in Enzymology 29, 33 (1967)
25. PARSONS, B.J., SMYTH, D.H. and C.B. TAYLOR: J. Physiol. 144, 387 (1968)
26. POST, R.L. and A.K. SEN: J.Gen. Physiol. 54, 306 (1969)
27. QUAI, J.F. and W. McD. ARMSTRONG: Proc.Soc.Exp.Biol. med, 131, 46 (1969)
28. RITTER, U.: Z. Ges. exp. Med. 138, 306 (1964)
29. ROSENBERG, I.H., COLEMANN, A.J. and L.E. ROSENBERG: Biochem. Biophys. Acta 102, 161 (1965)
30. ROSENBERG, Th. and W. WILBRANDT: Exp.cell.Res. 9, 49 (1955)
31. SALOMON, L., ALLUMS, J.A. and D.E. SMITH: Biochem. Biophys. Res. 4, 123 (1961)
32. SCHULTZ, S.G. and P.F. CURRAN: Physiologist 12, 437 (1969)
33. SCHULTZ, S.G. and ZALUSKY, R.: Biochem. Biophys. Acta 71, 503 (1963)
34. SEN, A.K., TOBIN, I. and R.L. POST: J.Biochem. 244, 6596 (1969)
35. SKOU,J.C.: Physiol. Rev. 45, 596 (1965)
36. WHEELER, K.P. and H.N. CHRISTENSEN: J. Biochem. 242, 3782 (1967)
37. VERZAR, F. and E.J. McDONGALL: Absorption from the intestine, London 1936
38. GARRAHAN, P.J. and J.N. GLYNN: Nature 207, 1098 (1965)
39. MÜLLER, F., BEYREISS, K. und E. STRACK: Z.ges. exp. Med. 138, 531 (1965)
40. VOGEL, H.: Unveröffentlichte Versuche, Leipzig 1973
41. BRÜCKNER, J.: Helv.physiol. Acta 9, 259 (1951)
42. McCORNACK,R.L.: J. Amer. Statis. Assoc. 60, 864 (1965)

Lebenslauf

Am 22. März 1948 wurde ich als zweite Tochter der Kaufleute Wilhelm und Maria Brand, geb. Schweikhard, in Halle/Saale geboren. Dort wurde ich 1954 eingeschult und beendete meine Schulzeit auf der August-Hermann-Francke-Oberschule in Halle mit dem Abitur.

Nach bestandenem Abitur absolvierte ich 1966/67 ein Krankenpflegejahr in der Universitäts-Hautklinik und in der Chirurgischen Universitätsklinik Halle und wurde 1967 an der Karl-Marx-Universität Leipzig immatrikuliert. Im August 1973 bestand ich das medizinische Staatsexamen und erhielt die Approbation als Arzt.

1973 bis 1974 arbeitete ich als Ausbildungsassistent für Arbeitshygiene/Betriebsarzt an der Martin-Luther-Universität in Halle. Nach Inhaftierung und Verurteilung wegen Vorbereitung zur Republikflucht mußte ich ab April 1975 im Staatlichen Gesundheitswesen Halle-Neustadt arbeiten. Seit der Geburt unseres zweiten Kindes war ich als Hausfrau tätig. Ende Januar 1978 kamen wir im Rahmen der Familienzusammenführung in die Bundesrepublik Deutschland. Seit Januar 1979 bin ich als Betriebsarzt beim TÜV-Rheinland beschäftigt.